Fernanda Benetti

Avaliação cromatográfica e estudos de sorção e de toxicidade em minhocas de
deltametrina, glifosato e ácido aminometilfosfônico

Tese apresentada ao Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica
Orientadora: Maria Olímpia de Oliveira Rezende

São Carlos
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Fernanda Benetti

Data: 03 de fevereiro de 2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Benetti, Fernanda

Avaliação cromatográfica e estudos de sorção e de toxicidade em minhocas de deltametrina, glifosato e ácido aminometilfosfônico. / Fernanda Benetti. — São Carlos, 2015.
262 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2015.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende

1. Cromatografia. 2. Glifosato. 3. Deltametrina. 4. Toxicidade. 5. ISO 17025. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

Para João, meu pai, meu herói.
Para Sandra, minha mãe, a quem sempre imitei.

DEDICO

A Deus, pela coroa da vida eterna, que Ele me dará se eu for fiel até o fim
Felipe, meu irmão. Tão diferente e tão igual a mim.

AGRADEÇO

Agradecimentos

À Profa. Maria Olímpia de Oliveira Rezende, pela orientação e confiança;

À Dra. Maria Diva Landgraf, pelo carinho, ensinamentos e ajuda;

Aos colegas do Laboratório de Química Ambiental: Leandro, Rachide, Darlan, Rut, Paula, Letícia, Ticiane, Rhaíssa e a mãe da Ana Elisa, Livia;

À Michelle Miyuki Kanashiro, minha aluna de iniciação científica que muito colaborou para a obtenção dos resultados obtidos nesta tese;

A Paulo Roberto Dore-Silva, meu amigo e praticamente meu coorientador;

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira, minha companheira de viagens e pela oportunidade de integração à comissão organizadora do XI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas;

Aos amigos são-carlenses, araraquarenses e paulistanos;

A minha família;

A Oscar dos Santos Neto, do Laboratório de Geotecnia da EESC, pela ajuda nos ensaios ali realizados;

À Secretaria de Agricultura da cidade de São Carlos, pelo levantamentos dos defensivos usados no município;

A Nei Aparecido Padovan, da Insetimax Indústria Química, pela cessão das amostras da formulação comercial de deltametrina com ausência do princípio ativo;

Ao pessoal da Oficina de Vidros do IQSC, pela paciência e disposição;

À Sílvia, Andréia e Gustavo, da Seção de Pós-Graduação, pelo bom atendimento;

À Veroneide Maria da Silva Athayde, secretária do Departamento de Física e Química Molecular, por seu bom humor;

Ao IQSC, pelo apoio institucional;

À FAPESP, pela bolsa concedida (Processo 2011/22651-8).

Resumo

No Brasil é sabido que o uso de insumos agrícolas para o melhoramento da produtividade é crescente. Dentre esses insumos, pode-se destacar o uso de pesticidas. Neste trabalho foi desenvolvida e validada metodologia para análise de deltametrina (um piretróide usado como inseticida) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta-visível (CLAE/UV). Também foram avaliadas a presença de glifosato (uma glicina substituída usada como herbicida) e de seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Essas metodologias foram aplicadas para análise de amostras de água, solo e sedimento no município de São Carlos (pontos de coordenadas 22°4'0.29"S;47°46'32.26"O e 22°4'30.10"S;47°46'42.37"O), a fim de avaliar a contaminação por esses xenobióticos. Para melhor elucidação do potencial contaminante e de lixiviação destes, avaliou-se sua interação com ácidos húmicos, além de estudos de adsorção em latossolo vermelho, pelos quais se verificou a grande influência da matéria orgânica na retenção de xenobióticos no solo. A fim de propor um método de remediação de solos em casos de contaminação por derramamento de formulações comerciais, testes de toxicidade (mortalidade, biomassa e reprodução) envolvendo minhocas *Eisenia foetida* com adição de 3% de vermicomposto foram executados. Todo o trabalho foi desenvolvido seguindo os requisitos de Gestão de Qualidade contempladas na norma ISO 17025.

Abstract

In Brazil it is known that the use of agricultural inputs to improve productivity has been increasing. Among these inputs, we can highlight the use of pesticides. In this work, it was developed and validated a methodology for deltamethrin analysis (a pyrethroid used as insecticide) by high performance liquid chromatography coupled by ultraviolet-visible detector (HPLC/UV). Glyphosate and its metabolite aminometilphosphonic acid (AMPA) were evaluated by gas chromatography coupled by mass spectroscopy (GC/MS). These methodologies were applied to analyze real samples of water, soil and sediment in the city of São Carlos (coordinate points 22°4'0.29 "S; 47°46'32.26"W and 22°4'30.10"S; 47°46'42.37"W) in order to evaluate the contamination by these xenobiotics. To elucidate the contaminant potential and leaching of these, we also evaluated the interaction with humic acids, and adsorption studies were performed in red latosol where there was a great influence of organic matter on xenobiotics retention in the soil. So as to propose a method for remediation of soils in cases of contamination by shedding of commercial formulations in soil, three toxicity tests (mortality, biomass and reproduction) involving *Eisenia foetida* earthworms with the addition of 3% of hummus were performed. All the study was developed in compliance with the Quality Management concepts covered in ISO 17025.

Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismo de ação do herbicida glifosato (via do chiquimato).....	50
Figura 2 – Rotas de decomposição microbiológica do glifosato.	53
Figura 3 – Esquema de um CLAE-UV.....	59
Figura 4 – Esquema de um CG-EM.....	61
Figura 5 – Reações de derivatização do glifosato e do AMPA usando TFAA e TFE.	62
Figura 6 – Esquema para extração de deltametrina em solo e sedimento	70
Figura 7 – Esquema de extração de deltametrina para amostras de água	76
Figura 8 – Fluxograma de derivatização das amostras para análise de glifosato e AMPA por CG-EM.	78
Figura 9 – Esquema de extração e purificação de amostras de água para análise de glifosato e AMPA.	80
Figura 10 – Esquema de extração e purificação de amostras de solo e sedimento para análise de glifosato e AMPA.	82
Figura 11 – Cromatograma obtido via CLAE-UV de uma amostra de água fortificada com 50 µg L ⁻¹ de solução padrão de deltametrina.....	83
Figura 12 – Cromatograma obtido via CLAE-UV de uma amostra de solo fortificada com 0,1 mg kg ⁻¹ de solução padrão de deltametrina.....	84
Figura 13 – Curva analítica para análise de deltametrina (EQUIPAMENTO – CLAE- UV).	87
Figura 14 – Curva analítica para análise de deltametrina (matriz ÁGUA).	87
Figura 15 – Curva analítica para análise de deltametrina (matriz LATOSSOLO VERMELHO).	88
Figura 16 – Curva analítica para análise de deltametrina (matriz SEDIMENTO).	88
Figura 17 – Curva analítica para análise de glifosato (EQUIPAMENTO – CG-EM).	90
Figura 18 – Curva analítica para análise de glifosato (matriz ÁGUA).....	90
Figura 19 – Curva analítica para análise de glifosato (matriz LATOSSOLO VERMELHO).	91
Figura 20 – Curva analítica para análise de glifosato (matriz SEDIMENTO).....	91
Figura 21 – Curva analítica para análise de AMPA (EQUIPAMENTO – CG-EM).	92
Figura 22 – Curva analítica para análise de AMPA (matriz ÁGUA).....	92

Figura 23 – Curva analítica para análise de AMPA (matriz LATOSSOLO VERMELHO).....	93
Figura 24 – Curva analítica para análise de AMPA (matriz SEDIMENTO).....	93
Figura 25 – Influência dos cinco fatores (tempo de extração (A), solvente extrator (B), método de extração (C), fluxo da fase móvel (D) e composição da fase móvel (E)) no teste de robustez de acordo com o teste de Youden.	102
Figura 26 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de água – PONTO 01. Nota-se que somente na amostra fortificada com 1000 µg L ⁻¹ detectou-se a presença do piretróide.	104
Figura 27 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de água – PONTO 02. Nota-se que somente na amostra fortificada com 1000 µg L ⁻¹ detectou-se a presença do piretróide.	104
Figura 28 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de latossolo vermelho – PONTO 01. A amostra possui traços do piretróide.	105
Figura 29 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de latossolo vermelho – PONTO 02. A amostra possui traços do piretróide.	106
Figura 30 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de sedimento. Não foi detectado traços do piretróide na amostra.....	107
Figura 31 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de sedimento – PONTO 2. Não foi detectado traços do piretróide na amostra.	107
Figura 32 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de água – PONTO 01. Nota-se que somente na amostra fortificada com 1000 µg L ⁻¹ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.	109
Figura 33 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de água – PONTO 02. Nota-se que somente na amostra fortificada com 1000 µg L ⁻¹ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.	109
Figura 34 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de latossolo vermelho – PONTO 01. Nota-se que somente na	

amostra fortificada com 100 µg L ⁻¹ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.....	110
Figura 35 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de latossolo vermelho – PONTO 02. Nota-se que somente na amostra fortificada com 100 µg L ⁻¹ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.....	110
Figura 36 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de sedimento – PONTO 01. Nota-se que somente na amostra fortificada com 100 µg L ⁻¹ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito. .	111
Figura 37 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de sedimento – PONTO 02. A amostra possui traços de AMPA.	112
Figura 38 – Classificação das isotermas de sorção.	123
Figura 39 – Curva de distribuição granulométrica do solo natural.	133
Figura 40 – Isotermas de Freundlich para adsorção de deltametrina em solo calcinado e em latossolo vermelho.	134
Figura 41 – Isotermas de Freundlich para dessorção de deltametrina em solo calcinado e latossolo vermelho.	135
Figura 42 – Isotermas de Freundlich para adsorção de glifosato em solo calcinado e latossolo vermelho.	136
Figura 43 – Isotermas de Freundlich para dessorção de glifosato em solo calcinado e latossolo vermelho.....	136
Figura 44 – Isotermas de Freundlich para adsorção de AMPA em solo calcinado e latossolo vermelho	137
Figura 45 – Isotermas de Freundlich para dessorção de AMPA em solo calcinado e latossolo vermelho.	137
Figura 46 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa (P < 0,05), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.....	169
Figura 47 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de	

deltametrina (sem e com princípio ativo), em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	172
Figura 48 – Variação de biomassa média ($n=5$) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	177
Figura 49 – Mortalidade média ($n=5$) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	179
Figura 50 – Função de decréscimo de biomassa dos experimentos de toxicidade envolvendo formulação comercial do herbicida glifosato.	183
Figura 51 – Perda de biomassa média ($n=5$) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	189
Figura 52 – Mortalidade média ($n=5$) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	191
Figura 53 – Função de decréscimo de biomassa dos experimentos de toxicidade envolvendo formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo.	195
Figura 54 – Reprodução de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), juvenis e ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	198

Figura 55 – Reprodução de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>) (presença de juvenis), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem princípio ativo, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	202
Figura 56 – Reprodução de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>) (presença de ovos), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	203
Figura 57 – Esquema de funcionamento de espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier.	210
Figura 58 – Esquema representativo de um espectrômetro de UV-Vis.	212
Figura 59 – Esquema representativo de um espectrômetro de fluorescência.	215
Figura 60 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos extraídos de solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato. Observa-se a presença das principais bandas referentes aos ácidos húmicos. Maiores detalhes no texto.	227
Figura 61 – Espectros de FTIR derivados dos ácidos húmicos extraídos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato (referência, solo + GLY e solo + GLY + VTF). Nota-se com maior nitidez as bandas envolvendo as interações entre glifosato e ácidos húmicos.	229
Figura 62 – Esquema de propostas de mecanismos de adsorção do glifosato pelos ácidos húmicos.	231
Figura 63 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos envolvendo o piretróide deltametrina (Referência, solo + DISP, solo + DISP + VTF, solo + DISP + VBL) – A e (solo + DELTA, solo + DELTA + VTF, solo + DELTA + VBL) – B. Observa-se a presença das principais bandas referentes aos ácidos húmicos.	232
Figura 64 - Espectros de FTIR derivados dos ácidos húmicos extraídos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (referência, solo + DISP, solo + DISP + VTF, solo + DISP + VBL) – A e solo + DELTA, solo + DELTA + VTF e solo + DELTA + VBL) – B.	234

Figura 65 - Proposta de mecanismos de adsorção da deltametrina pelos ácidos húmicos.	235
Figura 66 - Espectros de absorção na região do visível para os ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato ([AH] = 20 mg L ⁻¹ em NaHCO ₃ 0,05 mol L ⁻¹).	236
Figura 67 – Espectros de absorção na região do visível para os ácidos húmicos extraídos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (sem princípio ativo – A e com princípio ativo – B).([AH] = 20 mg L ⁻¹ em NaHCO ₃ 0,05 mol L ⁻¹).	238
Figura 68 – Espectros de varredura sincronizada obtidos de acordo com a metodologia sugerida por Kalbitz de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato.	240
Figura 69 – Grau de humificação I ₃₇₇ /I ₄₇₀ obtido segundo a metodologia por Kalbitz (2000) de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato.	240
Figura 70 – Espectros de emissão de fluorescência (λ _{exc} = 465 nm) de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato, de acordo com a metodologia sugerida por Milori.	241
Figura 71 – Grau de humificação A ₄₆₅ obtido segundo a metodologia de Milori (2002) de ácidos húmicos extraídos dos solos dos testes de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato. * = diferença estatisticamente significativa (P < 0,05), em relação à referência, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	242
Figura 72 – Espectros de varredura sincronizada obtidos de acordo com a metodologia sugerida por Kalbitz de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (sem princípio ativo – A e com princípio ativo – B).	243
Figura 73 – Grau de humificação de ácidos húmicos extraídos dos solos dos testes de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina, pela metodologia sugerida por Kalbitz. * = diferença estatisticamente significativa (P < 0,05), em relação à referência, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	244

Figura 74 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 465 \text{ nm}$) obtidos de acordo com a metodologia sugerida por Milori de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (sem princípio ativo – A e com princípio ativo – B).244

Figura 75 - Grau de humificação de ácidos húmicos extraídos dos solos dos testes de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina, pela metodologia sugerida por Milori. * = diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação à referência, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.245

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas da deltametrina.	47
Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas do herbicida glifosato.....	51
Tabela 3 – Propriedades físicas e químicas do AMPA.	54
Tabela 4 – Vantagens e desvantagens das técnicas de extração assistida por micro-ondas e por ultrassom para amostras sólidas.	57
Tabela 5 – Informações sobre a amostragem realizada para água, solo e sedimento.	66
Tabela 6 – Programação da rampa de temperatura para abertura de amostras sólidas para análise de nitrogênio Kjeldahl e fósforo.	68
Tabela 7 – Condições para extração de deltametrina via microondas.....	71
Tabela 8 – Avaliação da robustez para análise de deltametrina via CLAE-UV.....	75
Tabela 9 – Percentuais de recuperação para extração de deltametrina em solo via ultrassom utilizando hexano/acetona (9:1), acetato de etila e metanol como solventes extratores.	85
Tabela 10 – Resultados de recuperação de deltametrina obtidos para análise de solo e sedimento, extraídos via ultrassom. As recuperações encontram-se dentro do recomendado pela ANVISA e INMETRO. [68], [69]	86
Tabela 11 – Resultados de recuperação de deltametrina obtidos para análise de solo e sedimento, extraídos via microondas. As recuperações encontram-se dentro do recomendado pela ANVISA e INMETRO. [68], [69]	86
Tabela 12 – Limites de detecção e quantificação para glifosato e AMPA obtidos para diferentes matrizes	94
Tabela 13 – Avaliação da precisão do método de análise para deltametrina em três concentrações distintas – matrizes água e latossolo vermelho.....	95
Tabela 14 – Avaliação da precisão do método de análise para glifosato em três concentrações distintas – matrizes água e latossolo vermelho.....	96
Tabela 15 – Avaliação da precisão do método de análise para AMPA em três concentrações distintas – matrizes água e latossolo vermelho.....	96
Tabela 16 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intracorridas do método de análise de deltametrina em água e latossolo vermelho.	97

Tabela 17 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intercorridas do método de análise de deltametrina em água e latossolo vermelho.	98
Tabela 18 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intracorridas do método de análise de glifosato em água e latossolo vermelho.....	99
Tabela 19 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intracorridas do método de análise de AMPA em água e latossolo vermelho.....	100
Tabela 20 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intercorridas do método de análise de glifosato em água e latossolo vermelho.....	100
Tabela 21 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intercorridas do método de análise de AMPA em água e latossolo vermelho.....	101
Tabela 22 – Caracterização química das amostras de água, solo e sedimento coletadas para a análise de deltametrina, glifosato e AMPA.....	103
Tabela 23 – Composição mineral do solo natural	132
Tabela 24 – Resultados de Kf e 1/n da adsorção/dessorção de deltametrina, glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em solo calcinado (matriz 1) e em latossolo vermelho (matriz 2).	138
Tabela 25 – Potencial de lixiviação da deltametrina em latossolo vermelho de acordo com o índice de GUS.	141
Tabela 26 – Potencial de lixiviação do AMPA em latossolo vermelho de acordo com o índice de GUS	141
Tabela 27 – Potencial de lixiviação do glifosato em latossolo vermelho de acordo com o índice de GUS	142
Tabela 28 – Comparação dos valores de coeficiente de distribuição (Kd) de deltametrina, glifosato e AMPA com base nos dados de Koc segundo European Comiision (2002) com os dados obtidos experimentalmente das amostras de solo.	144
Tabela 29 – Parâmetros físico-químicos avaliados no solo natural utilizado nos testes de toxicidade envolvendo as formulações comerciais de glifosato e deltametrina.....	165
Tabela 30 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. P valor referente ao Teste de Dunnett para n=5.	168

Tabela 31 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural. P valor referente ao Teste de Dunnett para n=5.	170
Tabela 32 – Variação de biomassa percentual de cada réplica do teste de toxicidade envolvendo minhocas <i>Eisenia foetida</i> em formulação comercial de glifosato durante 28 dias, em solo natural.	175
Tabela 33 – Resumo dos dados para o teste ANOVA para os dados de toxicidade envolvendo minhocas <i>Eisenia foetida</i> em formulação comercial de glifosato durante 28 dias, em solo natural.	176
Tabela 34 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações da formulação comercial de glifosato, em solo natural.	177
Tabela 35 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de mortalidade percentual média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural.	179
Tabela 36 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 7 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural.	180
Tabela 37 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural.	180
Tabela 38 – Coeficiente de crescimento/decrescimento em relação às concentrações estudadas no experimento de toxicidade envolvendo formulação comercial do herbicida glifosato.	182
Tabela 39 – Variação de biomassa percentual de cada réplica do teste de toxicidade envolvendo minhocas <i>Eisenia foetida</i> em formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo durante 28 dias, em solo natural.	184

Tabela 40 – Resumo dos dados para o teste ANOVA para os dados de toxicidade envolvendo a formulação comercial de deltametrina (sem com princípio ativo).....	187
Tabela 41 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, sem e com princípio ativo, em solo natural.....	188
Tabela 42 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de mortalidade percentual média (n=5) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem princípio ativo, em solo natural.	190
Tabela 43 - Resumo dos dados para o teste de Dunnett para os dados de variação de biomassa média percentual (n=5) envolvendo minhocas <i>Eisenia foetida</i> em gradiente de concentração de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, durante os 7 primeiros dias, em solo natural.....	192
Tabela 44 – Resumo dos dados para o teste de Dunnett para os dados de variação de biomassa média percentual (n=5) envolvendo minhocas <i>Eisenia foetida</i> em gradiente de concentração de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, durante os 14 primeiros dias, em solo natural.....	193
Tabela 45 – Coeficiente de crescimento/decrescimento em relação às concentrações estudadas no experimento de toxicidade envolvendo formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo.	194
Tabela 46 – Resultado do teste de reprodução para minhocas <i>Eisenia foetida</i> , ao final de 56 dias, na presença de gradiente de formulação comercial de herbicida glifosato, em solo natural.....	196
Tabela 47 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (minhocas juvenis) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações da formulação comercial de glifosato, em solo natural.	197
Tabela 48 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (ovos) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural...	197

Tabela 49 – Resultado do teste de reprodução para minhocas <i>Eisenia foetida</i> , ao final de 56 dias, na presença de gradiente de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural.	199
Tabela 50 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (minhocas juvenis) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural.	200
Tabela 51 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (ovos) de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural.	201
Tabela 52 – Bandas de absorção dos principais grupos funcionais no espectro de infravermelho médio.	211
Tabela 53 – Nomenclatura original das amostras do teste de toxicidade e seu correspondente nome reduzido, utilizado para melhor interpretação dos resultados de caracterização dos ácidos húmicos.	219
Tabela 54 - Teor de nitrogênio total Kjeldahl e fósforo total no solo e após a realização dos testes de toxicidade.	223
Tabela 55 - Capacidade de troca catiônica em amostras de solo após a realização dos testes de toxicidade.	225
Tabela 56 - Teor de carbono total dos ácidos húmicos das amostras dos testes de toxicidade	226
Tabela 57 – Valores de razão E_4/E_6 para os ácidos húmicos extraídos das amostras de solo dos testes de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato, por espectroscopia no visível.	237
Tabela 58 – Valores de razão E_4/E_6 para os ácidos húmicos extraídos das amostras de solo dos testes de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina, por espectroscopia no visível.	239

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACN – Acetonitrila

AF – Ácidos Fúlvicos

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

AH – Ácidos Húmicos

AMPA – Ácido aminometilfosfônico

ANA – Agência Nacional de Águas

ANOVA – Analise of Variance

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM - American Society for Testing and Materials

Ce – Concentração do poluente no equilíbrio com o solo

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CEO – Concentração de Efeito Observado

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CG-DCE – Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de Captura de Elétrons

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CL – Concentração Letal

CL₂₀ – Concentração Letal (20% de mortalidade)

CL₅₀ – Concentração Letal (50% de mortalidade)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector Ultravioleta-Visível

CMD – Concentração Média Determinada

CQA – Controle de Qualidade de Média Concentração

CQB – Controle de Qualidade de Baixa Concentração

CQD – Controle de Qualidade de Diluição

CQM – Controle de Qualidade de Média Concentração

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTC – Capacidade de Troca Catiônica

CV – Coeficiente de Variação

DELTA – Deltametrina

DISP – Dispersante

DL – Dose Letal

DL₂₀ – Dose Letal (20% de mortalidade)

DPa – Desvio Padrão do coeficiente linear da curva analítica

DPR – Desvio Padrão Relativo

DTPMP – Ácido Dietilenotriamina Pentametileno Fosfônico

EDTMP – Ácido Etileno Diamina Tetrametileno Fosfônico

EPA – Environmental Protection Agency (United States)

EPSP – 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase

ER – Erro Relativo

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FTIR – Fourier Transformed Infrared

GC-ECD – Gas Chromatography accopled by électron capture detector

GL – Grau de Liberdade

GLY – Glifosato

GUS – Groundwater Ubiquity Score

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Nacionais Renováveis

IC – Coeficiente Angular da curva analítica

IEC - International Electrotechnical Commission

IHSS – International Humic Substances Society

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

ISO – International Organization for Standardzation

IUPAC – Internation Union of Pure and Applied Chemistry

Kd – Coeficiente de distribuição

Kf – Coeficiente de Freundlich

Koc – Coeficiente de partição octanol-água

LD – Limite de Deteção

LI – Limite Inferior

LIQ – Limite Inferior de Quantificação

LQ – Limite de Quantificação

LQA – Laboratório de Química Ambiental
LS – Limite Superior
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH – Metanol
MICRO – Micro-ondas
MO – Matéria Orgânica
MON – Matéria Orgânica Natural
MOS – Matéria Orgânica do Solo
MQ – Média dos Quadrados
MRC = Material de Referência Certificado
MS – Ministério da Saúde
NBR – Norma Brasileira
NKT – Nitrogênio Kjeldahl Total
NMDA – N-metil-D-aspartase
OECD – Organização Europeia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
POEA – Polietoxietileno Amina
PTFE – Politetrafluoroetileno
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RPE – Ressonância Paramagnética Eletrônica
S rec – Desvio Padrão da recuperação
SH – Substâncias Húmicas
SQ – Soma dos Quadrados
t-exp – Valor de t obtido experimentalmente
TFAA – Anidrido Trifluoroacético
TFE – Trifluoroetanol
TOC – Total Organic Carbon
t-tab – Valor de t tabelado
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
ULTRA – Ultrassom
USP – Universidade de São Paulo
UV-Vis – Ultravioleta-Visível
VBL – Vermicomposto de bagaço de laranja
VTF – Vermicomposto de torta de filtro

X rec – Média das recuperações

Sumário

Capítulo I – O Laboratório de Química Ambiental e a ISO/IEC 17025	31
1.1 Laboratórios universitários e o sistema de gestão de qualidade	31
1.2 ISO. O que é?	33
1.3 Histórico	34
1.4 Por que implantar?	35
1.5 Como implantar?	37
1.6 Vantagens e Dificuldades	40
1.7 Conclusão	43
Capítulo II – O piretróide deltametrina, o herbicida glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico e otimização de método cromatográfico para análise de amostras de água, solo e sedimento	44
2.1 Introdução	45
2.1.1 Pesticidas	45
2.1.1.1 Deltametrina	46
2.1.1.2 Glifosato	48
2.1.1.3 Ácido aminometilfosfônico	54
2.1.2 Métodos de extração	55
2.1.2.1 Extração via ultrassom	55
2.1.2.2 Extração via micro-ondas	56
2.1.3 Cromatografia	58
2.1.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	58
2.1.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	60
2.2 Objetivos	63
2.2.1 Objetivos Gerais	63
2.2.2 Objetivos Específicos	63
2.3 Metodologia	64
2.3.1 Lista de materiais	64
2.3.2 Lista de equipamentos	64
2.3.3 Limpeza do material	65
2.3.4 Amostragem	65
2.3.5 Caracterização físico-química das amostras	67
2.3.5.1 pH (potencial hidrogeniônico)	67

2.3.5.2 Matéria orgânica	67
2.3.5.3 Carbono	67
2.3.5.4 Nitrogênio Kjeldahl (NKT) e fósforo	68
2.3.6 Desenvolvimento da metodologia analítica: DELTAMETRINA	69
2.3.6.1 Otimização das condições cromatográficas	69
2.3.6.2 Otimização do solvente extrator	69
2.3.6.3 Otimização do processo de extração	70
2.3.7 Validação da metodologia	71
2.3.7.1 Preparação das amostras padrão (real e fortificada)	71
2.3.7.2 Seletividade	72
2.3.7.3 Linearidade	72
2.3.7.4 Limites de detecção e quantificação	72
2.3.7.5 Precisão	73
2.3.7.6 Exatidão (intra e intercorridas)	73
2.3.7.7 Robustez	75
2.3.7.8 Análise de amostras reais	75
2.3.8 Desenvolvimento de metodologia: GLIFOSATO/AMPA	76
2.3.8.1 Otimização das condições cromatográficas	76
2.3.9 Validação da metodologia	77
2.3.9.1 Preparação das amostras padrão (real e fortificada)	77
2.3.9.2 Linearidade	78
2.3.9.3 Limites de detecção e quantificação	79
2.3.9.4. Precisão	79
2.3.9.5. Exatidão	79
2.3.9.6. Análise de amostras reais	79
2.4 Resultados e Discussões	83
2.4.1 Otimização das condições cromatográficas para análise de deltametrina em água, solo e sedimento	83
2.4.2 Otimização do solvente extrator para análise de deltametrina em solo e sedimento	84
2.4.3 Otimização do processo de extração para análise de deltametrina	85
2.4.4 Linearidade e limites de detecção/quantificação	86
2.4.4.1 Deltametrina	86
2.4.4.2 Glifosato e AMPA	89

2.4.5 Precisão	95
2.4.5.1 Deltametrina	95
2.4.5.2 Glifosato e AMPA	96
2.4.6 Exatidão	97
2.4.6.1 Deltametrina	97
2.4.6.2 Glifosato e AMPA	99
2.4.7 Robustez para deltametrina	102
2.4.8 Análise de amostras reais	103
2.4.8.1 Deltametrina	103
2.4.8.2 Glifosato e AMPA	108
2.5 Conclusões	113
Capítulo III – Estudos de sorção de deltametrina, glifosato e AMPA em latossolo vermelho.....	114
3.1 Introdução	115
3.1.1 O conceito de sorção	115
3.1.2 Mecanismos de sorção	117
3.1.2.1 Sorção em argilas	117
3.1.2.1.1 Troca de ligantes	118
3.1.2.1.2 Ligação iônica	118
3.1.2.1.3 Ligação de hidrogênio	119
3.1.2.2 Sorção em matéria orgânica	119
3.1.2.2.1 Ligação iônica	120
3.1.2.2.2 Ligação de hidrogênio	120
3.1.2.2.3 Transferência de carga	121
3.1.2.2.4 Ligação covalente	121
3.1.2.2.5 Forças de Van der Waals	121
3.1.2.2.6 Troca de ligantes	121
3.1.2.2.7 Adsorção hidrofóbica e particionamento	121
3.1.3 Isotermas de sorção	122
3.1.4 Classificação das isotermas	122
3.1.4.1 Isotermas do tipo S	123
3.1.4.2 Isotermas do tipo L	123
3.1.4.3 Isotermas do tipo H	123
3.1.4.4 Isotermas do tipo C	124

3.1.5 Potencial de lixiviação	124
3.2 Objetivos	126
3.2.1 Objetivo Geral	126
3.2.2 Objetivos Específicos	126
3.3 Experimental	127
3.3.1 Materiais	127
3.3.1.1 Vidrarias	127
3.3.1.2 Reagentes	127
3.3.1.3 Equipamentos	127
3.3.1.4 Outros	127
3.3.2 Coleta e preparo das amostras	128
3.3.3 Análise granulométrica	128
3.3.4 Sorção de deltametrina e glifosato em latossolo vermelho e em solo calcinado	129
3.3.5 Coeficiente de distribuição (Kd) e coeficiente de distribuição do contaminante na fração orgânica do solo (Koc)	130
3.3.6 Cálculo do potencial de lixiviação	130
3.4 Resultados e Discussão	132
3.4.1 Análise granulométrica	132
3.4.2 Curvas de sorção	133
3.4.3 Potencial de lixiviação	140
3.5 Conclusões	145
Capítulo IV – Toxicidade de deltametrina e glifosato em minhocas <i>Eisenia</i> <i>foetida</i> e remediação de solos contaminados usando vermicompostagem....	146
4.1 Introdução	147
4.1.1 Toxicidade	147
4.1.2 Testes de toxicidade	148
4.1.3 O uso de minhocas em testes de toxicidade	149
4.1.4 O vermicomposto e a biorremediação de solos	150
4.1.5 Estatística	151
3.1.5.1 Teste ANOVA	152
3.1.5.2 Teste de Dunnett	152
4.2 Objetivos	154
4.2.1 Objetivo Geral	154

4.2.2 Objetivos Específicos	154
4.3 Experimental	155
4.3.1 Materiais.....	155
4.3.1.1 Vidrarias	155
4.3.1.2 Reagentes	155
4.3.1.3 Equipamentos	156
4.3.1.4 Outros	156
4.3.2 Coleta e caracterização inicial do solo usado para testes toxicológicos	156
4.3.2.1 pH (potencial hidrogeniônico)	157
4.3.2.2 Matéria orgânica	157
4.3.2.3 Umidade	157
4.3.2.4 Capacidade de troca catiônica.....	157
4.3.2.5 Carbono	159
4.3.3 Ensaios de Toxicidade	159
4.3.3.1 Organismos teste	159
4.3.3.2 Formulações comerciais	160
4.3.3.3 Purga de minhocas em papel de filtro umedecido	160
4.3.3.4 Preparo dos vermicompostos	160
4.3.3.5 Montagem dos experimentos	161
4.3.3.5.a Glifosato	161
4.3.3.5.b Deltametrina	161
4.3.3.6 Ensaios de Toxicidade Aguda (Mortalidade) e Ganho de Biomassa	162
4.3.3.7 Ensaios de Reprodução	162
4.3.3.8 CL ₂₀	163
4.3.4 Análises Estatísticas	163
4.3.4.1 ANOVA	163
4.3.4.2 Teste de Dunnett	163
4.4 Resultados e Discussões	165
4.4.1 Caracterização do solo	165
4.4.1.1 Análise granulométrica	165
4.4.1.2 pH, umidade, matéria orgânica, carbono e acidez trocável	165
4.4.2 Ensaios de Toxicidade	166

4.4.2.1 Ensaio de toxicidade aguda (mortalidade)	168
4.4.2.1.1 Glifosato	168
4.4.2.1.2 Deltametrina	170
4.4.2.2 Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO)	173
4.4.2.2.1 Glifosato	173
4.4.2.2.2 Deltametrina	173
4.4.2.3 Ensaio de biomassa	174
4.4.2.3.1 Glifosato	174
4.4.2.3.2 Deltametrina	183
4.4.2.4 Ensaio de reprodução	196
4.4.2.4.1 Glifosato	196
4.4.2.4.2 Deltametrina	199
4.5 Conclusões	205
Capítulo V – A interação da deltametrina e do glifosato com os ácidos húmicos	206
5.1 Introdução	207
5.1.1 Substâncias húmicas	207
5.1.2 Os ácidos húmicos e sua interação com pesticidas	208
5.1.3 Técnicas espectroscópicas	208
4.1.3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	209
4.1.3.2 Espectroscopia no Ultravioleta – Visível (UV-Vis)	211
4.1.3.3 Espectroscopia de Fluorescência	213
5.2 Objetivos	216
5.2.1 Objetivo Geral	216
5.2.2 Objetivos Específicos	216
5.3 Experimental	217
5.3.1 Materiais	217
5.3.1.1 Vidrarias	217
5.3.1.2 Reagentes	217
4.3.1.3 Equipamentos	218
4.3.1.4 Outros	218
5.3.2 Nomenclatura das amostras	218

5.3.3 Nitrogênio Kjeldahl (NKT) e fósforo	219
5.3.4. Capacidade de troca catiônica	219
5.3.5 Caracterização dos ácidos húmicos	220
5.3.5.1 Fracionamento químico	220
4.3.5.2 Análises espectroscópicas	221
4.3.5.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR)	221
4.3.5.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível (UV-Vis)	221
4.3.5.2.3 Espectroscopia de Fluorescência	222
5.3.6 Estatística	222
5.4 Resultados e discussões	223
5.4.1 Nitrogênio Kjeldahl e Fósforo	223
5.4.2 Capacidade de troca catiônica	224
5.4.3 Caracterização dos ácidos húmicos	225
5.4.3.1 Teor de carbono.....	225
5.4.4 Análises espectroscópicas	226
5.4.4.1 Espectroscopia no FTIR	227
5.4.4.1.1 Glifosato	227
5.4.4.1.2 Deltametrina	231
5.4.4.2 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível (UV-Vis)	236
5.4.4.2.1 Glifosato	236
5.4.4.2.2 Deltametrina	237
5.4.4.3 Fluorescência	239
5.4.4.3.1 Glifosato	239
5.4.4.3.2 Deltametrina	243
5.5 Conclusões	246
Referências Bibliográficas	247

Capítulo I

O Laboratório de Química Ambiental e a ISO/IEC 17025

1.1 Laboratórios universitários e o sistema de gestão de qualidade

As universidades são instituições de ensino e pesquisa que tem o papel de formar novos profissionais e de realizar pesquisa teórica e prática em todas as áreas do conhecimento, bem como divulgar seus resultados à comunidade.

Os laboratórios universitários são estruturas muito peculiares e dedicam-se ao mesmo tempo ao ensino, pesquisa, e extensão. Devem assegurar um alto grau de qualidade dos experimentos realizados e permitir que os alunos tenham acesso às metodologias experimentais inovadoras e a novas metodologias de análise de resultados. Dessa forma, estes laboratórios podem contribuir para uma aprendizagem e formação acadêmica mais completa, além de ajudar a sociedade via prestação de serviços. Os laboratórios universitários são um importante elo entre a universidade e a indústria, com a universidade disponibilizando metodologias e tecnologias inovadoras para a indústria e esta, por sua vez, trazendo a experiência prática para a universidade. [1]

A conciliação desses papéis não é tarefa trivial, visto a grande diversidade das atividades desenvolvidas e a limitação de recursos. Assim, os laboratórios da Universidade necessitam de um sistema da qualidade flexível, cujos procedimentos assegurem a qualidade dos trabalhos realizados e a acessibilidade ao conhecimento desenvolvido. Qualidade esta que, segundo a definição de Olivares (2009), é a capacidade de um produto em atender as necessidades e expectativas do cliente. Para que o produto tenha essa característica, ele precisa ser produzido dentro de um padrão, ou seja, dentro de um sistema de gestão de qualidade. [1], [2]

A grande preocupação dos cientistas e pesquisadores, em relação à adoção de um sistema de gestão da qualidade, é que o mesmo venha dificultar as pesquisas nos laboratórios ou até comprometer a independência científica de seus trabalhos. Esse pensamento está relacionado ao desconhecimento da norma, já que a ISO/IEC 17025, por exigir autonomia de gestão e isenção de influências externas, garante a independência da pesquisa. Além disso, os requisitos de gestão desta norma contribuem eficientemente para a administração do laboratório e a execução das tarefas. [1]

Em alguns países, os laboratórios universitários constituem as unidades mínimas da estrutura acadêmica, já no Brasil as unidades mínimas são os

departamentos; os laboratórios estão subordinados a eles. Deve-se, portanto, organizá-lo de modo que atenda às exigências da norma ISO/IEC 17025 e esteja em sintonia com a estrutura administrativa do departamento. Por outro lado, a instituição (departamento e universidade) deve estar consciente da importância das atividades do laboratório e da necessidade de sua acreditação pela norma, apoiando esta iniciativa. [1]

O Laboratório de Química Ambiental (LQA), do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, visando a garantir a qualidade de seus resultados, bem como promover a melhoria contínua de seu funcionamento, busca estar de acordo com os requisitos da ISO/IEC 17025.

1.2 ISO. O que é?

A ISO é a International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização). É uma entidade criada em Genebra, Suíça, cujas atividades iniciaram-se no ano de 1947. [3]

Seu objetivo principal é criar/aprovar normas que facilitem o comércio e promovam boas práticas de gestão e o avanço tecnológico, além de disseminar conhecimentos. Suas normas mais conhecidas são a ISO 9000, para gestão da qualidade, e a ISO 14000, para gestão do meio ambiente. No Brasil, a ISO é representada pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). [4], [5]

A sigla ISO é reconhecida internacionalmente, visto não ser a abreviatura de seu nome em inglês, nem em qualquer outro idioma. A sigla deriva do grego “isos”, que significa igual, sendo assim usada em qualquer país. [2]

A ISO é atualmente a maior entidade para o desenvolvimento de normas internacionais, sendo as mais conhecidas a ISO 9000 (referência internacional em requerimentos para qualidade) e 14000 (auxílio às organizações a estabelecerem suas metas ambientais).

1.3 Histórico

O conceito de qualidade, bem como o de sua gestão vem evoluindo concomitantemente à evolução do homem. Mas pode-se dizer que a grande evolução desse conceito se deu após a II Guerra Mundial, quando os japoneses precisaram desenvolver mecanismos para melhorar sua comunicação e começaram a produzir rádios de pilha, que anos mais tarde, tiveram sua produção aumentada devido à aplicação de conceitos de gestão de qualidade. [2]

Para a padronização de laboratórios de ensaio, o primeiro guia lançado pela ISO foi publicado em 1978, a ISO/IEC Guia 25, revisada em 1993. Esse guia foi um marco, pois foi a primeira tentativa da entidade em garantir a qualidade dos resultados obtidos pelos laboratórios, mas apresentava ambiguidades quanto a política de qualidade, rastreabilidade de medições e métodos de amostragem. Para resolver essa questão, em 1999 foi lançada a norma *ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*, oficialmente datada de 15 de dezembro de 1999 e publicada internacionalmente no início do ano 2000. No Brasil, foi publicada pela ABNT a NBR/ISO/IEC 17025 em janeiro de 2001. [6], [7]

A ISO 17025 estabelece os critérios para aqueles laboratórios que desejam demonstrar sua competência técnica, que possuem um sistema da qualidade efetivo e que são capazes de produzir resultados tecnicamente válidos. Os principais objetivos da norma são: [6], [7]

1 – Estabelecer um padrão internacional e único para assegurar a competência dos laboratórios para realizarem ensaios, incluindo amostragem. Tal padrão facilita o estabelecimento de acordos de reconhecimento mútuo entre os organismos de credenciamento nacionais;

2 – Facilitar a interpretação e a aplicação dos requisitos, evitando opiniões divergentes e conflitantes, reduzindo a necessidade de documentos explicativos adicionais.

1.4 Por que implantar?

No Brasil, para que um laboratório de ensaio possa trabalhar de acordo com a ISO/IEC 17025, é necessário que ele seja acreditado, isto é, credenciado pelo órgão capacitado, no caso o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). Até o momento, essa acreditação é feita de forma voluntária, porém o número de entidades (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Nacionais Renováveis, MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) que exigem que os laboratórios tenham o sistema é cada vez maior. [2]

A acreditação é aberta para qualquer laboratório que realize ensaios, seja ele particular ou vinculado a organizações públicas ou privadas.[2]

A garantia de qualidade é um conceito que os laboratórios de pesquisa devem buscar continuamente e que, após o surgimento da ISO/IEC 17025, permitiu-se que isso fosse obtido de forma racional e palpável, dando credibilidade para o laboratório. [8] O laboratório que busca se acreditar a um sistema de gestão de qualidade procura: [6]

- 1 – Aprimorar seus processos;
- 2 – Aumentar a segurança de suas análises e de sua equipe;
- 3 – Melhorar a qualidade global do trabalho;
- 4 – Oferecer maior confiabilidade aos resultados;
- 5 – Diminuir custos operacionais (manutenção preventiva de equipamentos e eliminação de reanálise de amostras);
- 6 – Melhorar a imagem do laboratório no meio científico, pois terá rastreabilidade e confiabilidade em seus resultados (melhoria contínua).

As revistas científicas estão cada vez mais atentas não apenas à forma de apresentação dos resultados, mas também ao modo como foram obtidos. Nesse contexto, a aplicação da ISO/IEC 17025 é de grande relevância econômica, pois confere um valor diferenciado aos relatórios de ensaio, teses, dissertações, artigos etc., emitidos por laboratórios cuja competência técnica é

reconhecida por um organismo de acreditação. Esse reconhecimento poderá reverter-se em vantagens para os laboratórios, tais como: [6]

1 – Diferencial competitivo, fator de divulgação e marketing, o que poderá resultar em maior participação no mercado e, conseqüentemente, maior reconhecimento;

2 – Fidelização de parceiros e conquista de novas parcerias, uma vez que a acreditação confirma e reconhece a competência técnica do laboratório para produzir dados e resultados tecnicamente válidos, o que aumenta a sua credibilidade;

3 – Laboratórios que fazem parte de organizações maiores e que operam em conformidade com os requisitos da ISO/IEC 17025 poderão comprovar que as metodologias propostas pela organização foram ensaiadas e são tecnicamente capazes de atenderem às especificações de desempenho, segurança e confiabilidade;

4 – O uso da ISO/IEC 17025 facilitará a cooperação entre laboratórios e outros organismos, auxiliando na troca de informações e experiências, bem como na harmonização de normas e procedimentos, o que poderá significar redução de custos.

1.5 Como implantar?

Olivares (2009) recomenda que, quando se trata de laboratórios de pesquisa, é necessário que haja clareza sobre qual atividade ele realiza, se é pesquisa básica ou aplicada, pois os objetivos são diferentes. Um laboratório de pesquisa básica apresenta foco em publicações, patentes, participação em congressos científicos etc. Quando se trata de pesquisa aplicada, este ainda pode apresentar duas subdivisões, uma que trata de resolver problemas específicos (seja na área ambiental, nutricional ou clínica) e outra relacionada com a investigação toxicológica e dos impactos ambientais de substâncias químicas, ambas de acordo com as exigências e necessidades de diferentes clientes. [2]

Na pesquisa básica, é preciso considerar o envolvimento dos alunos dos cursos de pós-graduação, logo, a aplicação de um sistema de gestão de qualidade ajuda a criar um ambiente mais próximo do mundo real. Outra vantagem também destacada é a colaboração do sistema de gestão de qualidade na geração de dados consistentes para serem publicados em revistas científicas, que cada vez mais, exigem critérios como os relacionados à validação de metodologias e cálculo de incertezas de resultados, ferramentas de qualidade comumente utilizadas em qualquer sistema de gestão de qualidade para laboratório. [2]

Uma vez definido o tipo de pesquisa que o laboratório realiza, é preciso verificar quais os tipos de ensaios são realizados, possibilitando estabelecer as características principais do laboratório e sua relação com a universidade. Na realidade, para os laboratórios universitários, a definição do escopo (descrição das atividades do laboratório) dos serviços está sempre ligada aos interesses dos grupos de pesquisa e à tradição da instituição de ensino. [1]

Durante a implementação do sistema de gestão de um laboratório, é necessário que existam as seguintes fases: planejamento, responsabilidade de gestão, de formação de qualidade, preparação da documentação, validação de métodos analíticos, implementação do sistema de controle de qualidade analítica e auditorias internas. [2], [9]

Para que esse processo seja feito de modo satisfatório, é necessário considerar os seguintes aspectos: [9]

- 1 – Cultura da organização;
- 2 – Necessidade real para a acreditação;
- 3 – Tempo e recursos disponíveis;
- 4 – Conhecimento do pessoal e experiência anterior em qualidade e;
- 5 – Avaliação das condições atuais do laboratório com referência ao cumprimento da norma.

Após essa triagem inicial, o processo de acreditação na ISO/IEC 17025 consiste em basicamente 10 etapas: [2], [9]

- Passo 1: Definir o escopo de ensaios a ser realizado;
- Passo 2: Avaliar a real situação do laboratório;
- Passo 3: Cálculo dos custos;
- Passo 4: Definir agenda e responsabilidades;
- Passo 5: Mapear e analisar os processos envolvidos;
- Passo 6: Estabelecer os requisitos de gestão;
- Passo 7: Estabelecer os requisitos técnicos;
- Passo 8: Monitorar os indicadores definidos anteriormente;
- Passo 9: Avaliar o sistema de gestão de qualidade;
- Passo 10: Solicitar a acreditação no INMETRO.

O LQA estruturou sua documentação em procedimentos técnicos (relacionados à rotina do laboratório, tais como validação de metodologias, amostragem, inspeção de amostras e calibração de instrumentos de medição), procedimentos de gestão (relacionados ao gerenciamento da qualidade, tais como aquisição de serviços e suprimentos, controle de documentos e registros, ações corretivas e preventivas e controle de não conformidades) e procedimentos operacionais padrão (relacionado à manutenção das atividades, tais como limpeza do laboratório e vidrarias, descarte de resíduos e avaliação da calibração de equipamentos) a fim de organizar o trabalho dos pesquisadores e facilitar a rastreabilidade dos documentos.

Durante o desenvolvimento desta tese de doutorado uma das preocupações foi manter todos os dados experimentais devidamente

registrados, a fim de facilitar a rastreabilidade dos resultados e garantir a qualidade dos mesmos.

Portanto, os resultados apresentados neste documento tiveram seus dados obtidos de acordo com os documentos internos do LQA, por sua vez, amparados no sistema ISO/IEC 17025.

1.6 Vantagens e Dificuldades

Num primeiro momento, que pode durar alguns meses, ou até mesmo nos primeiros anos, dependendo da dinâmica de implantação do sistema, o processo de implantação dá a impressão que o trabalho rotineiro fica mais rígido e moroso.

Em uma interpretação mais cuidadosa, é possível notar que a ISO/IEC 17025 apenas garante que a rastreabilidade dos resultados e a melhoria contínua sejam metas a serem constantemente perseguidas.

O LQA viveu momentos em que a implantação do sistema de qualidade fluiu muito bem, porém, conforme o processo ia se aprofundando, algumas dificuldades foram surgindo, principalmente no tocante à adaptação da norma à realidade do laboratório (sem comprometer nenhum requisito técnico e gerencial) e ao capital humano (com o perfil e número de alunos mudando periodicamente).

No ano de 2005, o INMETRO divulgou resultados de duas pesquisas. A primeira delas, intitulada “Pesquisa sobre ISO revela interesse do usuário” mostrou que a implantação de um sistema de gestão melhora a imagem do laboratório/empresa perante o mercado/clientes (86,4%), mas que as principais dificuldades levantadas para o sistema de gestão da qualidade são a carência de pessoal capacitado para implementar o sistema (65,1%) e a falta de clareza de como o sistema de gestão pode melhorar o funcionamento do laboratório (21,5%). [10]

A segunda pesquisa, intitulada “Pesquisa de credibilidade das certificações ISO 9000” foi realizada em conjunto com a ABNT e apresentou alguns resultados interessantes. O principal motivo que levou os laboratórios/empresas a implantarem o sistema foi a pressão externa de clientes e outros parceiros (32%) a busca pela melhora da qualidade de seus resultados (20%). Como melhoria, o mais citado foi a melhoria da organização interna dos documentos e como dificuldades para a implantação foram a mudança de cultura do local (25%) e a resistência de funcionários/alunos (21%).

Outros resultados muito semelhantes às pesquisas do IMMETRO foram reportados por alguns autores de países como Brasil, Grécia, Estados Unidos,

Israel, Portugal e Itália, em suas publicações. Pode-se afirmar o LQA compartilhou dos mesmos problemas e benefícios da acreditação no sistema ISO. [11]–[17]

Grochau e Ten Caten (2012) implantaram a ISO/IEC 17025 em dois laboratórios na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e perceberam que a dificuldade em se implantar um sistema de gestão está em não se ter definições claras das funções e responsabilidades de cada membro do grupo, por esse mesmo grupo ser temporário (o corpo discente é constantemente alterado) e a falta de uma metodologia para acreditação desencoraja muitos laboratórios a implementarem o sistema. [9]

Algumas das dificuldades e limitações que os autores listaram foram:

- 1 – a prestação de serviços não é prioridade nos laboratórios universitários;
- 2 – os laboratórios trabalham simultaneamente com pesquisa e ensino e;
- 3 – o desempenho da equipe é comumente medido com base em suas atividades de ensino e publicações e não em resultados, como numa empresa.

No que se refere a benefícios, os autores listaram:

- 1 – aumento da satisfação dos clientes/parceiros (agências de fomento e população brasileira – que a mantem com impostos);
- 2 – aumento da confiabilidade dos resultados e;
- 3 – redução do dano ou problemas de mau funcionamento de equipamento. [9]

Tanabe e Souza (2006) afirmam que o setor de recursos humanos é um dos principais focos das dificuldades na implantação, principalmente pelo conhecimento trazido de experiência anterior e resistência do grupo às mudanças. Quando o laboratório não tem nenhuma política de qualidade já definida, a cultura interna do mesmo interfere muito. A frase mais dita é “sempre fizemos dessa forma e deu certo”. Outro ponto que atrapalha o bom andamento da gestão da qualidade é a falta de comprometimento da alta direção que, no aspecto prático da universidade, seriam os docentes e os técnicos responsáveis pelo mesmo, e isso contraria um dos itens da norma que cita justamente do envolvimento da direção no processo. Outro fator é a

burocracia gerada, devido ao aumento da quantidade de documentos requisitados. [18]

A implantação de um sistema da qualidade visando apenas à certificação pode gerar desmotivação nos funcionários e discentes principalmente quando a alta direção não está comprometida com a certificação. Quando esta não se responsabiliza pela implantação, ela acaba terceirizando o processo para outros membros da equipe e, nesse caso, a dificuldade está em exigir que outros se empenhem e, principalmente, se sintam motivados a colaborar com algo em que a alta direção não está comprometida. [18]

Olivares (2009) afirma também que o grande volume de documentos, a dificuldade na aplicação destes (que muda a sistemática de trabalho, conseqüentemente, aumenta a burocracia) também são vistas como entraves, mas que a realidade deve ser vista com otimismo, pois apesar das dificuldades naturais do planejamento e desenvolvimento de um sistema de gestão da qualidade, trabalhar em um ambiente certificado traz grande satisfação para a vida profissional, o que também gera qualidade. [2]

1.7 Conclusão

O foco deste capítulo introdutório foi apresentar o sistema de gestão de qualidade ao qual o Laboratório de Química Ambiental procura se adequar.

A acreditação pelo INMETRO é um objetivo do LQA e é um reconhecimento da competência do laboratório, além de abrir oportunidades de parcerias com entidades internacionais que já utilizam oficialmente um sistema de gestão para garantia de seus resultados.

Não existe uma fórmula pronta de como esse processo de implantação deve ser realizado. Cada laboratório deve ter conhecimento de sua rotina, e de acordo com as suas necessidades, se adequar ao que é pedido pela ISO 17025. O LQA se compromete em implantar o sistema, buscando uma futura acreditação.

As atividades de acreditação e manutenção da qualidade visam à melhoria contínua do sistema, isto é, não devem ser vistas como um custo ou mesmo como um objetivo pontual a ser atingido e sim como um investimento que trará retornos satisfatórios ao laboratório e aos que trabalham e usufruem dele.

Capítulo II

O piretróide deltametrina, o herbicida glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico e otimização de método cromatográfico para análise de amostras de água, solo e sedimento

2.1 Introdução

2.1.1 Pesticidas

Os pesticidas são compostos orgânicos de origem antrópica, de alta toxicidade e são apontados como causadores de muitos danos à saúde humana, à flora e à fauna. [19]

Pesticida é toda substância ou mistura usada na prevenção, destruição ou combate de pragas (organismos que impactam negativamente seres humanos ou seus bens). Também pode ser definido como qualquer agente físico, químico ou biológico capaz de exterminar plantas, animais ou micro-organismos indesejáveis. O grupo dos pesticidas, ou agrotóxicos, pode ser também classificado, segundo sua função: inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas e molusquicidas. [20], [21]

O aumento da oferta global de alimentos e combustíveis exige a intensificação da agricultura, já que há pouco espaço para a expansão da terra. A intensificação da agricultura envolve a utilização de melhores espécies de sementes, uso mais eficiente da água e melhor nutrição para as plantas. Mas também conta com o uso mais intensivo de pesticidas, que, apesar de eles próprios não contribuírem diretamente para melhor colheita, ajudam a controlar os danos potenciais causados por diversas pragas. É importante constatar que dos 3 bilhões de quilogramas de pesticidas produzidas anualmente no mundo, 75% é destinado à agricultura. [21], [22]

Esse aumento no uso de pesticidas representa um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, especialmente aqueles com economias baseadas no agronegócio, como é o caso do Brasil. [23] Schreinemachers e Tipraqsa (2012) em seu estudo sobre a intensificação da agricultura no mundo afirmam que em nosso país houve crescimento no uso de pesticidas por hectare e isso está relacionado ao fato do país combater suas pragas pelo uso de pesticidas sintéticos, que está relacionado ao conhecimento limitado e incentivo dos agricultores em usá-los. E isso é um desafio na gestão de pesticidas de forma segura e sustentável. [22]

2.1.1.1 Deltametrina

Um piretróide é um inseticida sintético muito similar a substâncias produzidas pelas flores, conhecidas como piretrinas. Esses inseticidas são muito comuns em repelentes para insetos e inseticidas domésticos. [24]

Os piretróides estão substituindo pesticidas convencionais como organoclorados, organofosforados e carbamatos devido à sua maior fotoestabilidade, baixa persistência ambiental, maior atividade inseticida e baixa toxicidade em mamíferos. O uso de piretróides sintéticos iniciou-se nos anos 70 e estão entre os inseticidas mais potentes e eficazes disponíveis, responsáveis por 30% do mercado mundial. [25], [26]

A baixa toxicidade de inseticidas piretróides para mamíferos, aves e sua limitada persistência no solo tem incentivado o uso generalizado de piretróides na agricultura e controle de vetores de doenças. São usados para proteger produtos armazenados, como cereais, grãos, café e feijões secos e para o controle de doenças como Chagas e malária (via controle de vetores). [25]

A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas do piretróide deltametrina.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas da deltametrina.

Nome comercial	Deltametrina
Nome IUPAC	((S)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)- 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato
Fórmula molecular	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$
Massa molecular	505,2 g mol ⁻¹
Fórmula estrutural
Ponto de fusão	100-102°C
Solubilidade em água	0,0002 mg L ⁻¹ , 25°C
Solubilidade em solvente orgânico	Acetona: 300-600 g L ⁻¹ ; 20°C Acetonitrila: 60-75 g L ⁻¹ , 20°C Metanol: 8,15 g L ⁻¹ ; 20°C n-heptano: 2,47 g L ⁻¹ ; 20°C

Fonte: European Comission – Deltamethin (2002). [27]

A deltametrina ((S)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato) é um piretróide de amplo espectro, usado no controle de pragas invasoras, que atua por contato ou ingestão e é considerado o mais eficaz dos piretróides sintéticos. Os inseticidas piretróides são divididos em duas classes toxicológicas distintas (de acordo com o nível de intoxicação), sendo que a deltametrina pertence à classe II. [26] Nesta classe os compostos determinam efeitos que parecem ser de origem central, produzindo salivação excessiva, movimentos irregulares dos membros, convulsões tônicas e clônicas e sensibilidade aumentada aos estímulos externos. Os compostos da classe II promovem uma despolarização persistente na membrana do nervo pelo influxo contínuo de íons Na⁺, com redução na amplitude do potencial de ação e colapso na condução axonal, prejudicando, assim, a transmissão do impulso nervoso. [28]–[30] Estudos recentes de Kumar e colaboradores (2015) afirmam que a deltametrina,

justamente por essa característica, também pode ser usada como um agente de combate ao câncer. [31]

Esta alteração é reversível, com o retorno à normalidade das funções dos canais de sódio pela ausência do composto piretróide. Os compostos piretróides não apresentam atividade anticolinesterásica e determinam um pequeno efeito na sensibilidade muscular da acetilcolina. [28]–[30]

No Brasil, de acordo com a AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil), existem 8 produtos comerciais registrados tendo a deltametrina como o ingrediente ativo para uso em 35 culturas. [32]

2.1.1.2 Glifosato

O glifosato, nome comercial da N-fosfonometil-glicina, é um herbicida pertencente ao grupo das glicinas substituídas, pós-emergente, não seletivo e de ação sistêmica, usado para a eliminação de plantas invasoras em culturas. É o ingrediente ativo do herbicida comercial Roundup®, comercializado pela Monsanto. É comercializado desde 1974 e sua utilização é suscetível a aumentar ainda mais, pois é um dos herbicidas mais usados em culturas de plantas geneticamente modificadas. A soja Roundup Ready (RR) da Monsanto foi a primeira planta transgênica a ser aprovada para alimentação humana e animal e para cultivo no Brasil. A soja RR foi modificada por técnicas de DNA recombinante (DNAr) pela inserção de um gene da bactéria *Agrobacterium sp.*, que a torna resistente ao herbicida glifosato. [33]–[35]

As aplicações do produto devem ser dirigidas sobre as plantas invasoras seguindo as recomendações técnicas das boas práticas agrícolas. Se for utilizado dessa forma, não causará qualquer interferência no desenvolvimento e produtividade das culturas para as quais é recomendado. [36]

O glifosato é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes) e transferido, preferencialmente, pelo floema, para os tecidos meristemáticos. [36]

O modo primário de ação do herbicida se dá pela interferência na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos em

plantas, que é possível devido à inibição competitiva da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP), conforme ilustrado na Figura 1 que é responsável pela síntese de um intermediário na biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano, o corismato. Com isso, as plantas não conseguem produzir os aminoácidos essenciais para sua sobrevivência, o que provoca diminuição do crescimento, ruptura e morte celular. [37]–[40]

Figura 1 – Mecanismo de ação do herbicida glifosato (via do chiquimato).

Fonte: PRIESTMAN et al, 2005; TONI et al, 2006. [40], [41]

O glifosato apresenta custo relativamente baixo e excelente eficiência agrônômica, o que se reflete na sua grande aplicação. Assim, os cuidados relacionados à possibilidade de contaminação do ambiente com esta molécula devem ser estudados cautelosamente porque há evidências de efeitos deletérios no ambiente após seu uso prolongado. É importante preparar-se

para outro risco, visto que a formulação mais comercializada no país contém um surfactante com ação irritativa dermatológica, conhecido como POEA (polietoxietileno amina). [42]

A exposição cutânea ao glifosato tem sido analisada como agente de contribuição para o Mal de Parkinson. Pesquisadores propõem que o glifosato pode contribuir nessa patologia neurológica em virtude da sua semelhança química com a glicina, um co-fator necessário para a ativação do N-metil-D-aspartase (NMDA), que controla ações excitatórias no sistema nervoso central e também está envolvida na memória e aprendizado. [38]

Mesmo possuindo grande eficiência, o glifosato não tem ação sobre as sementes das plantas invasoras no solo e, portanto deve ser aplicado quando as espécies a serem eliminadas estão em desenvolvimento, preferencialmente em solo seco. Entretanto, esse herbicida pode ter várias aplicações, tais como no controle de plantas invasoras, nas culturas de ameixa, banana, cacau, pêra, pêssigo, seringueira, entre outras. [33]

A Tabela 2 apresenta algumas das propriedades físicas e químicas do glifosato.

Tabela 2 – Propriedades físicas e químicas do herbicida glifosato.

Nome comercial	Glifosato
Nome IUPAC	N-fosfonometil glicina
Fórmula molecular	$C_3H_8NO_5P$
Massa molecular	169 g mol^{-1}
Fórmula estrutural
Ponto de fusão	$189,5^{\circ}\text{C}$
Solubilidade em água	$10,5 \text{ g L}^{-1}$, 20°C , pH 2
Solubilidade em solvente orgânico	Acetona: $0,078 \text{ g L}^{-1}$; 20°C Acetato de etila: $0,012 \text{ g L}^{-1}$; 20°C Metanol: $0,231 \text{ g L}^{-1}$; 20°C n-hexano: $0,026 \text{ g L}^{-1}$; 20°C

Fonte: European Commission - Review report for the active substance glyphosate (2002). [43]

A degradação do glifosato no solo é muito rápida e realizada por uma grande variedade de microrganismos, que usam o produto como fonte de

energia e fósforo, por meio de duas rotas catabólicas, produzindo sarcosina, como metabólito intermediário na rota alternativa, e o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como o principal metabólito [44], [45]

Existem duas vias principais de degradação microbiana do glifosato; a primeira envolve a clivagem da ligação C-N da molécula produzindo o AMPA. A segunda é pela clivagem da ligação C-P do composto, produzindo sarcosina, conforme mostra a Figura 2. Os microrganismos possuem a capacidade de metabolizar esses compostos e transformá-los em energia e nutrientes para sua sobrevivência. [38], [45]

Figura 2 – Rotas de decomposição microbiológica do glifosato.

Fonte: AMARANTE JÚNIOR et al, 2002. [45]

Os herbicidas em geral, quando aplicados por vários anos, podem ter sua degradação mais acelerada em relação ao produto aplicado pela primeira vez, pois os microrganismos estão mais adaptados ao composto e possuem enzimas específicas para metabolizar o composto. [46]

Segundo a AGROFIT, no Brasil há 49 produtos registrados tendo o glifosato como ingrediente ativo para uso em 22 culturas. [32]

2.1.1.3 Ácido aminometilfosfônico

O ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o principal metabólito do herbicida glifosato.

Embora tenha toxicidade baixa (DL_{50} é de 8300 mg kg^{-1}), o AMPA é mais persistente que o glifosato. Estudos estimam que a meia-vida do glifosato pode ser inferior a 3 dias, enquanto a meia-vida do AMPA varia entre 119 e 958 dias [41]. No ambiente, as concentrações mais altas de glifosato e AMPA são encontradas no solo. A aplicação direta de glifosato como herbicida em águas superficiais pode ser responsável pela contaminação em água potável. [45] A Tabela 3 apresenta algumas propriedades físicas e químicas do AMPA.

Tabela 3 – Propriedades físicas e químicas do AMPA.

Nome comercial	Não há
Nome IUPAC	Ácido aminometilfosfônico
Fórmula molecular	$\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$
Massa molecular	111 g mol^{-1}
Fórmula estrutural
Ponto de fusão	285°C
Solubilidade em água	58 g L^{-1} , 20°C , pH 2
Solubilidade em solvente orgânico	Virtualmente insolúvel em acetona, diclorometano, éter dietílico, hexano e tolueno

Fonte: THIER, H. P.; KIRCHHOFF, J. 2006. [47]

O AMPA também é produto de degradação de alguns detergentes. Os detergentes derivados do ácido fosfórico, como o ácido etileno diamina tetrametileno fosfônico (EDTMP) ou o ácido dietilenotriamina pentametileno fosfônico (DTPMP) podem ser degradados a AMPA e encontrados no meio ambiente. [48]

2.1.2 Métodos de extração

2.1.2.1 Extração via ultrassom

A extração de analitos em amostras sólidas é um passo crítico na análise de contaminantes. Deve-se avaliar o método de extração sempre levando em conta os seguintes aspectos: seletividade para os componentes de interesse, recuperação do analito, volume do solvente orgânico necessário, toxicidade do solvente, tempo de extração e número de passos de *clean-up* após a extração. Cada técnica tem seu próprio mérito e a escolha da extração depende, ainda, de outros fatores como o custo de capital, o custo e a simplicidade de operação e a disponibilidade de um método padrão ou validado. [49]

Vários solventes são comumente usados para a extração de poluentes em solo e sedimento. Há procedimentos de extração que incluem Soxhlet, ultrassom, agitação mecânica, refluxo com KOH e destilação a vapor, e técnicas que incluem extração por fluido supercrítico e extração líquida pressurizada, entre outras. Algumas delas são recomendadas por órgãos internacionais, mas geralmente são processos tediosos, longos e requerem grande quantidade de solvente, além da possibilidade de degradar compostos termicamente lábeis. Atualmente, outras técnicas de extração em amostras ambientais sólidas têm sido desenvolvidas para tentar reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente como, por exemplo, por ultrassom. Em comparação à extração por Soxhlet, a extração por ultrassom ocorre em curto espaço de tempo (cerca de 15 min) e oferece boa recuperação dos analitos, por meio de um equipamento simples e de fácil operação. [49]

Na extração por ultrassom, o processo de extração baseia-se na ação de ondas mecânicas de baixa frequência, as quais são responsáveis pela formação e colapso de microbolhas ocasionando áreas pontuais de alta pressão e temperatura na solução. A ação do ultrassom facilita a extração dos poluentes, a sedimentação do material particulado em suspensão e promove a quebra de células vegetais. Além disso, a extração é de simples operação e

eficiente para extração de elementos em amostras de alimentos e solos, não necessitando de longos períodos para o preparo das amostras nem da utilização de altas temperaturas e pressão elevada. [50]

A otimização dos parâmetros de extração por ultrassom, incluindo tipo de solvente ou composição do solvente, tempo de extração, carga da amostra e teor de água, é necessária para a obtenção de uma maior eficiência e reprodutibilidade de extração. Além disso, para melhorar a recuperação obtida, usa-se um solvente polar, como acetona ou metanol, minimizando-se, assim, a necessidade da secagem das amostras antes da extração. A secagem de amostras contendo analitos voláteis ou semi-voláteis é um fator de erro, devido à perda destes. Até cerca de 16% de perdas de hidrocarbonetos têm sido observadas, em consequência da secagem das amostras em forno a 45 °C. O uso de altas temperaturas na extração em Soxhlet também resulta em perdas de hidrocarbonetos atribuídas à volatilização e/ou oxidação de espécies altamente voláteis e termodinamicamente lábeis. Vários estudos têm sido relatados, mostrando a eficiência de extração por ultrassom de analitos orgânicos em sedimento e solo utilizando diferentes solventes. [49]

2.1.2.2 Extração via micro-ondas

Várias técnicas têm sido aplicadas para extração de pesticidas do solo e cada uma apresenta suas vantagens e limitações. A extração sólido-líquido pode ser auxiliada com solvente, sob agitação e/ou aquecimento, para melhorar a eficiência de extração dos analitos, utilizando-se um micro-ondas ou um ultrassom, sendo conhecida como extração assistida por micro-ondas ou extração assistida por ultrassom. Ambas as técnicas foram desenvolvidas como alternativas à extração Soxhlet, sendo mais rápidas e requerendo menores quantidades de solvente. A extração assistida por micro-ondas pode ser realizada com o uso de um micro-ondas industrial ou caseiro, sendo muito empregada para determinação de resíduos de poluentes em solo. De forma semelhante à técnica de extração por ultrassom, ela utiliza solventes orgânicos ou misturas desses com água, com pH modificado ou não, visando a melhorar a eficiência de extração. Além disso, apresenta a vantagem de poder ser

realizada à temperatura ambiente, o que permite a determinação de compostos termolábeis. A Tabela 4 mostra as principais vantagens e desvantagens das técnicas de extração por ultrassom e micro-ondas.[51]

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens das técnicas de extração assistida por micro-ondas e por ultrassom para amostras sólidas.

Técnica de extração	Vantagens	Desvantagens
Extração por micro-ondas	Rapidez; Baixo consumo de solvente; Extração de várias amostras simultaneamente; Aumento de seletividade.	Possibilidade de degradação de alguns compostos; São necessárias etapas adicionais de clean-up e concentração de analitos; Baixa eficiência de extração para compostos apolares.
Extração por ultrassom	Rapidez; Baixo consumo de solvente; Extração de várias amostras simultaneamente; Aumento de seletividade; Equipamento simples; Baixo custo.	Possibilidade de degradação de alguns compostos (se a extração utilizar temperaturas altas); São necessárias etapas adicionais de clean-up e concentração de extrato.

Fonte: MORAIS, E.H. C. et al, 2013. [51].

Apesar das desvantagens, como necessidade de realização de etapas de clean-up do extrato e/ou concentração dos analitos, o ultrassom é muito utilizado para extração de agrotóxicos do solo pela boa eficiência de extração e, principalmente, pela disponibilidade dos materiais necessários e pelo equipamento utilizado ser simples e de baixo custo. [51]

2.1.3 Cromatografia

2.1.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais usadas atualmente, pois a maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para a cromatografia gasosa, logo, a CLAE apresenta vantagens na análise de compostos orgânicos. Esta técnica se difundiu a partir da década de 50 por Martin e Synge (prêmio Nobel de Química em 1952), sendo utilizada para separação de diversas substâncias, para análises qualitativas e quantitativas. Amostras não voláteis e termolábeis são preferencialmente analisadas via CLAE, devido à sua agilidade, sensibilidade e precisão, que, apesar do alto custo e sofisticação, é aplicada em diversos tipos de matrizes (proteínas, antibióticos, hidrocarbonetos etc.). [52]

Para ser determinada, a amostra é distribuída em duas fases imiscíveis, uma móvel, líquida, e uma fase estacionária (uma fase fixa de um líquido em sólido, ou sólido fixo aderido à superfície sólida). As separações ocorrem por diversos modos, de acordo com o tempo de retenção e tipo de equilíbrio envolvido (partição, troca iônica, exclusão por tamanho ou adsorção) [52]. A Figura 3 mostra um esquema de um CLAE-UV.

Figura 3 – Esquema de um CLAE-UV.

Fonte: SNYDER, L. et al, 2011. [53]

O detector utilizado (UV-Vis) baseia-se no princípio de absorção de luz quando pela amostra passa uma radiação eletromagnética (ultravioleta/visível) [54]. Existem três tipos diferentes de detectores UV: o detector de comprimento de onda fixo, de onda variável e o por arranjo de diodos. No primeiro tipo, apenas um comprimento de onda é utilizado, restringindo-se a análises de compostos que absorvam no comprimento de onda em que eles operam. No detector de comprimento de onda variável, é possível escolher um comprimento mais adequado a cada análise. Estes podem emitir luz ultravioleta por lâmpada de deutério como também na região do visível, utilizando-se lâmpada de tungstênio, cobrindo uma faixa de 190-800 nm, não havendo necessidade de troca das lâmpadas. Já os detectores de arranjo de diodos fornecem espectros no UV-Vis do eluente da coluna em determinados intervalos de tempo. Em um arranjo de diodos, os elementos fotossensíveis individuais são pequenos fotodiodos de silicone. São especialmente úteis para o desenvolvimento de métodos, por possibilitarem uma “varredura” da região UV-Vis em uma única corrida cromatográfica, para análise de amostras desconhecidas [52], [55].

2.1.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia gasosa é, atualmente, uma das técnicas mais usadas para análises quantitativas, principalmente em análise ambiental, farmacêutica, alimentícia e petroquímica. É também utilizada como método de identificação quando acoplada a um espectrômetro de massas [54].

A espectrometria de massas é muito utilizada como detector cromatográfico, pois permite a obtenção de informações tanto qualitativas como quantitativas. O espectrômetro pode ser altamente seletivo ao analito de interesse [52].

A espectrometria de massas necessita de alto vácuo para evitar colisões moleculares durante a separação dos íons; já a cromatografia é intrinsecamente uma técnica de alta pressão. O problema ao acoplar as duas técnicas é a remoção da grande quantidade de matéria presente entre o cromatógrafo e o espectrômetro [52].

A análise/separação consiste no bombardeamento de cada pico eluído da coluna cromatográfica por uma fonte energizante (geralmente impacto de elétrons), em que o composto é fragmentado em uma grande diversidade de íons. Os íons são separados em um analisador (quadrupolo submetido a um campo elétrico). A interação dos fragmentos iônicos com o campo elétrico faz com que apenas íons de determinada relação massa/carga (m/z) passem intactos, sem colidirem com o quadrupolo [56]. A Figura 4 mostra o esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas.

Figura 4 – Esquema de um CG–EM.

Fonte: LANÇAS, F.M, 1993. [56]

A fonte de íons por impacto de elétrons funciona da seguinte maneira: a temperatura da amostra é elevada a valor suficiente para promover sua evaporação, sendo, em seguida, bombardeada por feixes de elétrons energéticos [55].

As fontes por impacto de elétrons geram correntes iônicas grandes, o que dá uma boa sensibilidade. A grande fragmentação também é vantajosa, pois facilita a identificação de picos não-ambíguos. Porém, às vezes o fragmento do íon molecular pode desaparecer, o que impossibilita a determinação da massa molecular dos analitos [55].

Para se analisar glifosato e AMPA por essa técnica, é necessário que estes analitos passem por uma reação de derivatização com anidrido trifluoroacético (TFAA) e trifluoroetanol (TFE). A Figura 5 mostra a reação envolvida.

Figura 5 – Reações de derivatização do glifosato e do AMPA usando TFAA e TFE.

Fonte: SOUZA et al, 2006. [42]

É interessante destacar que, para obtenção de resultados mais fidedignos, é necessário aguardar 24 horas após o término da reação de derivatização para a realização das análises cromatográficas. [42]

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o uso de glifosato, AMPA e deltametrina, a fim de se conhecer a qualidade dos produtos agrícolas, bem como prevenir contaminações.

2.2.2 Objetivos Específicos

Validar metodologia de análise em água, solo e sedimento para os três xenobióticos estudados.

2.3 Metodologia

2.3.1 Lista de materiais

2,2,2-trifluoroetanol (Sigma-Aldrich);
Acetato de Etila (Tedia);
Acetonitrila (Panreac, grau HPLC);
Ácido clorídrico PA (HCl);
Água isenta de orgânicos (Milli-Q – Sistema Millipore);
Anidrido trifluoroacético (Tedia);
Extran® (Merck);
Hexano (Panreac, grau HPLC);
Metanol (Panreac, grau HPLC);
Padrão Ácido aminometilfosfônico (AMPA): Sigma-Aldrich (Laborchemikalien GmbH lote MRBC 7625; validade: 14/09/2015);
Padrão Deltametrina: Sigma Aldrich (Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze) Deltamethrin Pestanal®, validade em 23.10.2015;
Padrão Glifosato: Sigma-Aldrich (Laborchemikalien GmbH lote 13023ME; validade: 30/05/2015);
Papel de filtro comum;
Resina de troca aniônica (Amberlite IRA 420);
Resina de troca catiônica (Amberlite IR 120);
Solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹;
Solução de NaOH 1,0 e 10,0 mol L⁻¹.

2.3.2 Lista de equipamentos

Balança Analítica – BG 1000 Gehaka;
Centrífuga (Novatecnica NT810);
CLAE-UV (Shimadzu UFLC 20A);
Estufa (Quimis);
Mesa Agitadora (Tecnal – TE 140);
Mufla (EGG 1800);

pHmetro – pHMeter Tec 2 – Tecnal;

Rotaevaporador Fisatom 802 D;

Sistema GC/MS Shimadzu;

TOC – V_{CPH} modelo 5000A Shimadzu;

2.3.3 Limpeza do material

O procedimento de lavagem das vidrarias foi executado de acordo com o “Guia nacional de coleta e preservação de amostras - água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos”, publicado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) em parceria com a Agência Nacional de Águas (ANA). [57]

Todas as vidrarias foram imersas em solução de detergente Extran® alcalino (Merck) por 24 horas e enxaguada em água corrente, água destilada, água isenta de orgânicos e acetona, de modo sequencial. A secagem foi feita em estufa (100 °C por 2 horas).

2.3.4 Amostragem

A NBR ISO/IEC 17025, no item 5.7 afirma que o laboratório deve ter um plano e procedimentos de amostragem (quando este o faz). Devem ser baseados em métodos estatísticos apropriados e seu processo deve abranger fatores a serem controlados de forma a assegurar a validade dos resultados do ensaio. [7]

As amostras de água, solo e sedimento coletadas para a análise de deltametrina, glifosato e AMPA foram coletadas em propriedade rural, onde se preservam características do bioma cerrado em dois pontos distintos (22°4'0.29"S;47°46'32.26"O e 22°4'30.10"S;47°46'42.37"O) no município de São Carlos, São Paulo.

O documento base utilizado para a elaboração do procedimento de amostragem foi o Guia nacional de coleta e preservação de amostras – água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos, publicado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e Agência Nacional

de Águas (ANA) em 2011. [57] A Tabela 5 mostra as condições da coleta das amostras.

Tabela 5 – Informações sobre a amostragem realizada para água, solo e sedimento.

Temperatura no dia	22°C
Umidade relativa do ar	50% (sem chuva)
Amostragem	Distribuição aleatória com amostras compostas
Profundidade	15 cm (solo/sedimento) 30 cm (água superficial)
Técnica de refrigeração e transporte	Caixa de isopor com gelo (< 4°C)
Recipiente utilizado	Frasco âmbar com tampa plástica de boa vedação
Equipamentos para amostragem	Pá (solo/sedimento) Balde (água superficial)
Conservantes	Para NKT, fósforo e carbono: H ₂ SO ₄ (1:1) até pH 2 (água) Análises de solo: resfriamento em gelo (exceto granulometria)
Observações	Coleta de água foi realizada antes da coleta de sedimentos

Fonte: autoria própria

Para todas as determinações de solo e sedimento, utilizaram-se amostras secas à 40°C em estufa e peneiradas em peneira de 2 mesh, salvo quando descrito outro procedimento.

2.3.5 Caracterização físico-química das amostras

2.3.5.1 pH (potencial hidrogeniônico)

Adicionaram-se 100 mL de solução de CaCl_2 , com concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, a 10 g da amostra de solo seco. A suspensão foi mantida em agitação por 30 minutos. Posteriormente, o pH da suspensão foi determinado por meio do pHmetro, previamente verificado com soluções tampão de pH 4 e 7. O experimento foi realizado em quintuplicata. [58]

A determinação da acidez nas amostras de água procedeu-se através da inserção direta do eletrodo de pH na amostra. O experimento foi realizado em quintuplicata.

2.3.5.2 Matéria orgânica

Colocaram-se 10 g da amostra seca (solo/sedimento) em mufla a 550°C por 4 horas. O experimento foi realizado em quintuplicata. Com os dados obtidos e por meio da Equação 1, o teor de matéria orgânica foi calculado. [59]

$$\% \text{ MO} = \frac{P_s - P_m}{P_s} \times 100 \quad (1)$$

Onde: % MO: porcentagem de matéria orgânica na amostra.

P_s : massa da amostra inicial.

P_m : massa da amostra após a combustão.

2.3.5.3 Carbono

Colocaram-se 100 mg da amostra de solo/sedimento seco em um equipamento tipo TOC (aparelho TOC-VCPH Shimadzu, acoplado a um módulo para amostras sólidas SSM-5000A Shimadzu, com detector de combustão) para que a porcentagem de carbono total e inorgânico fosse determinada. O experimento foi realizado em quintuplicata.

Para as amostras de água, foi utilizado o equipamento TOC-VCPH Shimadzu com análise direta das amostras. O experimento foi realizado em quintuplicata.

2.3.5.4 Nitrogênio Kjeldahl (NKT) e fósforo

Primeiramente as amostras de solo e sedimento secas precisaram passar por um processo de abertura, que foi realizado em forno de micro-ondas (Berghof Speed Wave Four). Cerca de 0,25 g de amostra de solo foram pesados e, em seguida, adicionaram-se 7 mL de H₂SO₄ 98% e 2 mL de H₂O₂ 29%. O sistema permaneceu em digestão por 50 minutos. Em seguida, após esfriamento, as amostras foram avolumadas para 100 mL com água destilada. A Tabela 6 mostra as condições do micro-ondas para a abertura das amostras.

Tabela 6 – Programação da rampa de temperatura para abertura de amostras sólidas para análise de nitrogênio Kjeldahl e fósforo.

Etapa	1	2	3	4	5
Temperatura (°C)	150	160	180	210	50
Pressão (bar)	40	40	40	40	35
Rampa	5	2	2	2	0
Tempo (min)	10	10	20	5	0
Potência (%)	70	80	90	90	0

Fonte: Laboratório de Química Ambiental – documento interno.

As leituras de NKT e fósforo total foram feitas no Espectrofotômetro UV-Vis HACH, modelo DR 6000 operando em modo absorbância. Para análise de NKT foi utilizado o método 399 HACH (utilizando indicador TKN – ácido propiônico e água desmineralizada e reagente de Nessler). Para fósforo foi utilizado o método 480 HACH (molibdato-vanadato).

As amostras de água foram submetidas à análise direta pelo espectrofotômetro, sem etapa de abertura.

2.3.6 Desenvolvimento da metodologia analítica: DELTAMETRINA

2.3.6.1 Otimização das condições cromatográficas

Para as condições cromatográficas (utilizando o equipamento Proeminence UFLC, Shimadzu), uma solução padrão de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi injetada no cromatógrafo alterando as seguintes variáveis: comprimento de onda do detector, comprimento da coluna de separação, fluxo da fase móvel, composição da fase móvel e solvente de arraste. Após este estudo, a melhor relação sinal/ruído para os compostos analisados foi obtida nas seguintes condições:

Comprimento de onda: 225 nm;

Coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 4,6 x $5\mu\text{m}$);

Fluxo da fase móvel: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ em modo isocrático;

Solvente de arraste: acetonitrila;

Composição da fase móvel: Acetonitrila (90%) e água (10%);

Volume de amostra injetado: 20 μL .

2.3.6.2 Otimização do solvente extrator

Para se verificar qual solvente é o melhor extrator de deltametrina em solo/sedimento, foi utilizada a técnica de ultrassom para a extração do analito nas amostras.

Foram avaliados três solventes extratores: hexano:acetona (9:1), acetato de etila e metanol, sendo o percentual de recuperação o parâmetro utilizado para comparação.

O método de extração proposto foi: em 2 g de amostra de solo seca (dopadas com 1 mL de solução de deltametrina a $150 \mu\text{g L}^{-1}$), colocaram-se 10 mL de solvente extrator e o sistema foi sonificado em ultrassom por 10 minutos em banho de gelo. Em seguida filtrou-se a amostra em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e o eluato foi para rotaevaporador (para evaporação total do solvente), onde a

amostra foi ressuspensa em 1 mL de acetonitrila e em seguida, injetada em CLAE-UV. A Figura 6 apresenta o fluxograma da etapa de extração.

Figura 6 – Esquema para extração de deltametrina em solo e sedimento

Fonte: autoria própria

2.3.6.3 Otimização do processo de extração

Para buscar uma maior sensibilidade, iniciou-se a otimização do processo de extração, utilizando as técnicas de extração por micro-ondas e ultrassom, para posterior análise em CLAE-UV.

Nesta etapa foi necessário utilizar uma matriz isenta de deltametrina para ser fortificada e a seguir analisada. Desta maneira, foi preparada uma amostra de latossolo vermelho. Apesar da pouca volatilidade do piretróide, antes da fortificação, a amostra foi colocada em estufa durante 8h à 300°C, para garantir que seja extraído qualquer composto volátil ou semi-volátil, capaz de influenciar nos resultados. Após a esterilização, o solo foi armazenado em recipiente de vidro sob abrigo de luz.

Para o ensaio em micro-ondas, a extração foi baseada no estudo de Esteve-Turrilas e colaboradores (2004) [60], com a mudança do solvente

orgânico e sem etapa de clean-up. 2,000 g de amostra de solo foram dopadas com concentração conhecida de deltametrina e mantidas sob agitação durante 24h. Após volatilização do solvente, a amostra foi colocada em tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) e foram acrescentados 10 mL de metanol grau HPLC. O tubo foi fechado e inserido no micro-ondas. As condições usadas para extração estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Condições para extração de deltametrina via microondas

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rampa (W min ⁻¹)	Tempo de extração (min)	Potência (W)	Quantidade de amostra (g)	Solvente extrator
50	35	2	10	710	2,000	MeOH (10 mL)

Fonte: autoria própria

Para o ensaio em ultrassom, o procedimento realizado foi o descrito na Figura 6.

2.3.7 Validação da metodologia

2.3.7.1 Preparação das amostras padrão (real e fortificada)

Seguindo as determinações dos documentos internos do Laboratório de Química Ambiental, baseadas no documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 “Orientações sobre validação de métodos analíticos”, de 2011, a validação de metodologia para análise de deltametrina envolve as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, limites de detecção/quantificação, precisão, exatidão e robustez. [61]

Para tal, preparou-se solução estoque do piretróide à concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila. Para os ensaios prepararam-se soluções de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150 e 200 µg L⁻¹ em água.

A determinação de deltametrina foi realizada via CLAE-UV.

2.3.7.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada analisando os cromatogramas dos extratos de cada matriz sem e com o analito de interesse. Os cromatogramas com o analito de interesse foram obtidos injetando 20 μL de solução de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de deltametrina em água e 20 μL de solução de 0,1 mg kg^{-1} de deltametrina em amostra de latossolo vermelho em CLAE-UV. As condições cromatográficas foram ajustadas de modo que a deltametrina não coelua com nenhum interferente.

2.3.7.3 Linearidade

Foram construídas quatro curvas analíticas distintas: uma com matriz água, outra com matriz latossolo vermelho, outra com matriz sedimento e uma última em ausência de matriz. As concentrações usadas são as descritas no item 2.3.7.1.

Para cada ponto, foram injetadas sete (7) réplicas, sendo estas replicatas de todo o processo de extração, não apenas da injeção das amostras. Para as curvas de latossolo vermelho e sedimento, 2 g da amostra foram fortificadas com 1 mL de solução das respectivas concentrações do item 2.3.7.1 e extraídas em ultrassom por 10 min, conforme Figura 6. Para a curva em água, 100 mL da amostra foram fortificadas com 1 mL das respectivas concentrações e prosseguiu-se a extração ilustrada na Figura 7.

2.3.7.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação teóricos para as três matrizes avaliadas foram calculados pela avaliação dos dados obtidos das respectivas curvas analíticas, de acordo com Ribani e colaboradores (2004). [62]

Para o cálculo do limite de detecção (LD), foi utilizada a Equação 2:

$$LD = (DPa \times 3) \div IC \quad (2)$$

onde: DPa é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;
IC é o coeficiente angular da reta.

Para o cálculo do limite de quantificação (LQ), foi utilizada a Equação 3:

$$LQ = (DPa \times 10) \div IC \quad (3)$$

onde: DPa é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;
IC é o coeficiente angular da reta.

2.3.7.5 Precisão

A precisão foi determinada por intra-corridas, observando concordância entre os resultados obtidos pelo equipamento, mas com analistas diferentes. Ela foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 4:

$$DPR = (DP \div CMD) \times 100\% \quad (4)$$

onde: DP é o desvio padrão dos dados;
CMD, a concentração média determinada.

Para a determinação da precisão do ensaio, foi usado como base a Resolução RDC nº27 da ANVISA, que estabelece, para matrizes complexas, um coeficiente de variação $\leq 15\%$ para que o método seja considerado preciso.

2.3.7.6 Exatidão (intra e intercorridas)

Para o cálculo da exatidão foi calculado o erro relativo (ER), que é expresso em porcentagem através da Equação 5:

$$ER = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100 \quad (5)$$

Onde: X lab = valor obtido experimentalmente (ou média das recuperações);

Xv = valor aceito como verdadeiro (valor certificado no MRC);

MRC = material de referência certificado (no MRC há um valor de concentração ou outra grandeza, com sua respectiva incerteza que pode ser usado no cálculo de ER).

O documento do INMETRO não deixa claro quais os pontos são os mais adequados para a avaliação da exatidão, mas a RDC 27 da ANVISA especifica 5 pontos onde a exatidão deve ser avaliada. São eles: [63]

- 1 – LIQ (Limite Inferior de Quantificação): menor ponto da curva analítica;
- 2 – CQB (Controle de Qualidade de Baixa Concentração): 3 vezes o LIQ;
- 3 – CQM (Controle de Qualidade de Média Concentração): média entre limites inferior e superior da curva analítica;
- 4 – CQA (Controle de Qualidade de Média Concentração): 75 a 80% do LIQ;
- 5 – CQD (Controle de Qualidade de Diluição): acima do limite superior da curva (valor determinado via diluição).

Para o método ser considerado exato, admite-se valores de erro até 15% do valor considerado verdadeiro, aceitando-se 20% apenas para o LIQ.

A exatidão intracorridas foi realizada durante uma mesma corrida analítica. A exatidão intercorridas foi realizada em 3 corridas (um dia para cada corrida). [63]

2.3.7.7 Robustez

Para os testes de robustez foi executado o teste de Youden e foram modificados os parâmetros tempo (A), solvente (B), equipamentos para extração (C), fluxo da fase móvel (D) e composição da fase móvel (E), conforme a Tabela 8.

Tabela 8 – Avaliação da robutez para análise de deltametrina via CLAE-UV.

Parâmetro	1	2	3	4	5	6	7	8
A	10	12	10	12	10	12	10	12
B	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	ACN	ACN	ACN	ACN
C	ULTRA	ULTRA	MICRO	MICRO	ULTRA	ULTRA	MICRO	MICRO
D	1	1	0,9	0,9	0,9	0,9	1	1
E	90	85	90	90	85	85	85	90
	s	t	u	v	w	x	y	z

ULTRA – ultrassom

MICRO – micro-ondas

MeOH – metanol

ACN - acetonitrila

Fonte: autoria própria

2.3.7.8 Análise de amostras reais

As amostras de solo/sedimento foram extraídas de acordo com o procedimento mostrado na Figura 6, página 71. As amostras de água foram extraídas de acordo com a proposta de Barrionuevo e Lanças (2001), ilustrada na Figura 7. [64]

Figura 7 – Esquema de extração de deltametrina para amostras de água

Fonte: Autoria própria

Após extração, as amostras foram analisadas e quantificadas via CLAE-UV.

2.3.8 Desenvolvimento de metodologia: GLIFOSATO/AMPA

2.3.8.1 Otimização das condições cromatográficas

No que se refere aos processos de otimização das condições cromatográficas, solvente extrator e do processo de extração, estes foram baseados no trabalho de Silva e colaboradores (2015) e na dissertação de mestrado da autora, logo não serão detalhados novamente nesta sessão. [65], [66]

2.3.9 Validação da metodologia

2.3.9.1 Preparação das amostras padrão (real e fortificada)

Seguindo as determinações dos documentos internos do Laboratório de Química Ambiental, a metodologia para determinação de glifosato e AMPA já foi validada e publicada em trabalhos anteriores, logo, para a análise de glifosato e AMPA nas atuais amostras ambientais, as figuras de mérito a serem avaliadas serão: linearidade, limites de detecção/quantificação, precisão e exatidão. A robustez e a recuperação não foram avaliadas, pois o método para extração de glifosato e AMPA já é normalizado pelo laboratório, de acordo com a publicação de Silva et al, 2015. [65]

Para tal, preparou-se solução estoque mix de glifosato e AMPA à concentração de 1000 mg L^{-1} em água deionizada. Para os ensaios prepararam-se soluções de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150 200, 300, 400, 500 e $600 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Para análise das amostras, 1 mL de solução foi adicionada em ampolas de vidro, onde foram secas sob fluxo de nitrogênio, e logo após, adicionou-se 800 μL de TFAA e 400 μL de TFE. As ampolas foram lacradas em bico de Bunsen e em seguida, foram à estufa por 1 hora, a 100°C . Após atingirem a temperatura ambiente, as ampolas foram abertas e seu conteúdo foi submetido à fluxo de nitrogênio até a secura e ressuspendidas em 1 mL de acetato de etila. A Figura 8 mostra o fluxograma de preparação das amostras.

Figura 8 – Fluxograma de derivatização das amostras para análise de glifosato e AMPA por CG-EM.

Fonte: autoria própria

As determinações foram realizadas em um cromatógrafo a gás com detector de massas modelo QP 2010 Plus, da Shimadzu com injetor automático, no modo SIM. Os fragmentos monitorados para o AMPA foram m/z 246 e 302 e para o glifosato foram m/z 246, 260 e 411. O equipamento tem coluna capilar HP 5 da Hewlett-Packard, de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

2.3.9.2 Linearidade

Foram construídas quatro curvas analíticas distintas: uma com matriz água, outra com matriz latossolo vermelho, outra com matriz sedimento e uma com ausência de matriz. As concentrações usadas são as descritas no item 2.3.9.1.

2.3.9.3 Limites de detecção e quantificação

O procedimento para o cálculo dos limites de detecção e quantificação teóricos estão descritos no item 2.3.7.4. [62]

2.3.9.4. Precisão

O procedimento para a determinação da precisão do método está descrito no item 2.3.7.5.

2.3.9.5. Exatidão

O procedimento para a determinação da exatidão do método está descrito no item 2.3.7.6.

2.3.9.6. Análise de amostras reais

Para amostras de água, empacotou-se uma coluna de vidro de 1,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento com 6,0 mL de resina catiônica (Amberlite IR-120). 50,0 mL da amostra foi acidificada a pH 2 e eluída nessa coluna, que foi previamente condicionada com 20,0 mL de água deionizada, 40,0 mL de HCl ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e 1,0 mL de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$). Todo o eluato foi descartado. Após esse procedimento, eluiu-se o retido na resina com 1 x 2,8 mL e 2 x 3,7 mL de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$) sob fluxo de 2 mL min^{-1} . O eluato foi coletado em frasco de vidro ao qual se adicionou 4,0 mL de HCl 10 mol L^{-1} .

Em seguida, outra coluna com as mesmas características da anterior, foi empacotada com 5,0 mL de resina aniônica (Amberlite IRA-420) previamente condicionada com 3 x 2,5 mL de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$) e 1,0 mL de HCl concentrado, descartando-se todo o eluato. As substâncias retidas nessa coluna foram eluídas com 1 x 1,0 mL e 2 x 2,0 mL de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$). Posteriormente as amostras passaram por rotaevaporação até a secura e em

seguida adicionaram-se 5 mL de água deionizada, retornando-se à rotaevaporação.

Após essa etapa, as amostras foram recuperadas com 1,0 mL de solução de H₂O:MeOH:HCl (160:40:2,7) (v/v/v) e analisadas via CG-EM (após etapa de derivatização ilustrada na Figura 8). A Figura 9 ilustra o procedimento de extração de glifosato e AMPA em água.

Figura 9 – Esquema de extração e purificação de amostras de água para análise de glifosato e AMPA.

Fonte: autoria própria

A determinação de glifosato e AMPA foi realizada nas amostras de solo e sedimento pesando-se 10 g da amostra seca. Em seguida foram adicionados 25 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹ e levadas em banho de ultrassom durante 30 minutos, com controle de temperatura.

Logo após, as amostras foram levadas à centrífuga Novatecnica NT 810 a 3000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante de cada amostra foi filtrado em papel de filtro, e ao filtrado, adicionaram-se 4,2 mL de HCl concentrado, ajustando-se o pH para 2 e, em seguida, avolumou-se para 200 mL. Aproximadamente 50 mL da amostra foram separados para a etapa de purificação.

A etapa de purificação é realizada colocando-se os 50 mL da amostra para eluir em coluna empacotada com resina de troca catiônica (Amberlite IR-120) previamente condicionada com 20,0 mL de água deionizada, 40,0 mL de HCl (0,2 mol L⁻¹) e 1,0 mL de HCl (6,0 mol L⁻¹). Todo o eluato foi descartado. Após esse procedimento, eluiu-se o retido na resina com 1 x 2,8 mL e 2 x 3,7 mL de HCl (6,0 mol L⁻¹) sob fluxo de 2 mL min⁻¹. O eluato foi coletado em frasco de vidro e adicionando-se 6,0 mL de NaOH 10 mol L⁻¹ e o pH ajustado na faixa de 6-8.

Em seguida, o eluato tratado na resina de troca catiônica foi eluído na resina de troca aniônica (Amberlite IRA-420) previamente condicionada com 3 x 2,5 mL de HCl (6,0 mol L⁻¹) e 1,0 mL de HCl concentrado, descartando-se todo o eluato. As substâncias retidas nessa coluna foram eluídas com 1 x 1,0 mL e 2 x 2,0 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹.

Após isso a amostra foi armazenada em balão de fundo redondo e seca em rotaevaporador Fisatom 802 D a 60°C. Em seguida, adicionaram-se 5,0 mL de água deionizada e evaporou-se à secura novamente. Retomou-se o volume de cada amostra com 1 mL de uma solução de água:metanol:ácido clorídrico (160:40:2,7) (v/v/v), transferiu-se para ampola de vidro e procedeu-se a derivatização, conforme Figura 8. A Figura 10 ajuda a ilustrar o procedimento de extração de amostras sólidas para análise de glifosato e AMPA por CG-EM.

Figura 10 – Esquema de extração e purificação de amostras de solo e sedimento para análise de glifosato e AMPA.

EXTRAÇÃO

PURIFICAÇÃO

Fonte: autoria própria

2.4 Resultados e Discussões

Segundo Lanças (2004) [67], validar uma metodologia é dar a mesma validade, credibilidade e confiança. Assim, depois de desenvolvida e otimizada uma metodologia para análise de um xenobiótico em qualquer matriz, é necessário realizar sua validação dentro de conceitos bem definidos, de maneira a fornecer credibilidade e confiança à metodologia desenvolvida.

2.4.1 Otimização das condições cromatográficas para análise de deltametrina em água, solo e sedimento

As Figuras 11 e 12 apresentam os cromatogramas obtidos para comprovação da seletividade da deltametrina em amostras de água (fortificada com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão) e solo (fortificada com $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de solução padrão) respectivamente.

Figura 11 – Cromatograma obtido via CLAE-UV de uma amostra de água fortificada com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de solução padrão de deltametrina.

Fonte: autoria própria

Figura 12 – Cromatograma obtido via CLAE-UV de uma amostra de solo fortificada com 0,1 mg kg⁻¹ de solução padrão de deltametrina.

Fonte: autoria própria

É possível perceber que, para as duas matrizes, a deltametrina não coeluiu com nenhum interferente, portanto, o método proposto é seletivo para análise de deltametrina.

2.4.2 Otimização do solvente extrator para análise de deltametrina em solo e sedimento

A Tabela 9 mostra as porcentagens de recuperação obtidas para cada solvente distinto.

Tabela 9 – Percentuais de recuperação para extração de deltametrina em solo via ultrassom utilizando hexano/acetona (9:1), acetato de etila e metanol como solventes extratores.

Réplicas	Solventes		
	Hexano/Acetona	Acetato de Etila	Metanol
1	14,09%	43,48%	61,38%
2	20,35%	46,21%	57,09%
3	28,49%	46,67%	63,85%
4	21,75%	38,15%	96,08%
5	21,16%	44,41%	91,97%
6	24,96%	34,14%	87,96%
7	22,15%	42,93%	84,78%
8	24,20%	43,06%	73,31%
9	16,43%	38,87%	71,08%
média	21,51%	41,99%	76,39%

Fonte: autoria própria

Tendo em vista que o INMETRO [68], e a ANVISA [63] aceitam recuperações entre 70 e 120%, e que Ribani e colaboradores [62] recomendam, para matrizes complexas, recuperações entre 50 e 120%, percebe-se que o melhor solvente extrator avaliado foi o metanol.

2.4.3 Otimização do processo de extração para análise de deltametrina

Para a avaliação do melhor processo de extração foram construídas curvas analíticas para solo e sedimento utilizando as duas metodologias propostas (ultrassom e micro-ondas) sendo a recuperação usada como parâmetro para escolha do melhor método. As Tabelas 10 e 11 mostram as recuperações obtidas para duas matrizes estudadas. As extrações utilizadas estão descritas no item 2.3.6.2.

Tabela 10 – Resultados de recuperação de deltametrina obtidos para análise de solo e sedimento, extraídos via ultrassom. As recuperações encontram-se dentro do recomendado pela ANVISA e INMETRO. [68], [69]

Concentração avaliada (mg kg⁻¹)	Matriz	% de recuperação
0,0375	Sedimento	75,01
0,0625	Sedimento	80,47
0,1	Sedimento	85,90
0,0375	Solo	70,96
0,0625	Solo	96,80
0,1	Solo	119,02

Fonte: autoria própria

Tabela 11 – Resultados de recuperação de deltametrina obtidos para análise de solo e sedimento, extraídos via microondas. As recuperações encontram-se dentro do recomendado pela ANVISA e INMETRO. [68], [69]

Concentração avaliada (mg kg⁻¹)	Matriz	% de recuperação
0,0375	Sedimento	68,82
0,0625	Sedimento	90,24
0,1	Sedimento	87,12
0,0375	Solo	67,92
0,0625	Solo	85,73
0,1	Solo	82,21

Fonte: autoria própria

Analisando as duas tabelas, pode perceber-se que os dois métodos de extração apresentam recuperações dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA [63], INMETRO [68] e Ribani e colaboradores [62] (entre 50 e 120%), logo a escolha do melhor método de extração fica a critério do laboratório.

2.4.4 Linearidade e limites de detecção/quantificação

2.4.4.1 Deltametrina

As Figuras 13 a 16 apresentam as curvas analíticas obtidas de acordo com a recomendação do INMETRO para o equipamento e em três diferentes matrizes [61].

Figura 13 – Curva analítica para análise de deltametrina (EQUIPAMENTO – CLAE-UV).

Escala (log₁₀)

Fonte: autoria própria

Figura 14 – Curva analítica para análise de deltametrina (matriz ÁGUA).

Escala: (log₁₀)

Fonte: autoria própria

Figura 15 – Curva analítica para análise de deltametrina (matriz LATOSSOLO VERMELHO).

Fonte: autoria própria

Figura 16 – Curva analítica para análise de deltametrina (matriz SEDIMENTO).

Fonte: autoria própria

Foram determinadas quatro curvas distintas. A primeira delas foi construída a fim de verificar qual o limite mínimo que o equipamento consegue detectar o piretróide. Para esta curva, os limites de detecção e quantificação, foram respectivamente, de 0,07 e 0,22 µg L⁻¹.

As outras três curvas foram determinadas em três matrizes diferentes: água, latossolo vermelho e sedimento. Essa divisão foi necessária, pois em matrizes complexas, a presença de interferentes e outros compostos naturalmente presentes na matriz causam alterações na recuperação e na sensibilidade do método. Logo, os limites para latossolo vermelho foram de 0,01 e 0,03 mg kg⁻¹, respectivamente; para sedimento foram de 0,01 e 0,03 mg kg⁻¹, respectivamente e para água, o limite de detecção foi de 4,35 µg L⁻¹ e o limite de quantificação foi de 14,52 µg L⁻¹. É interessante destacar também que esses limites foram calculados de maneira empírica. Nos ensaios de exatidão, através dos valores de recuperação do método, é possível perceber se esses valores teóricos são diferentes ou não dos limites reais.

Com o objetivo de verificar se os limites de quantificação atendem as necessidades para realização de uma avaliação ambiental, é necessário que se comparem os limites obtidos com os já estabelecidos pela legislação. O documento Valores Orientadores da CETESB, de fevereiro de 2014, não contempla valores máximos permitidos para deltametrina em solos; na portaria do Ministério da Saúde MS 2914, de dezembro de 2011 tampouco é contemplado o piretróide em água.

2.4.4.2 Glifosato e AMPA

As Figuras 17 a 24 apresentam as curvas analíticas obtidas de acordo com a recomendação do INMETRO para o equipamento e em três diferentes matrizes [61].

Figura 17 – Curva analítica para análise de glifosato (EQUIPAMENTO – CG-EM).

Escala ($\log_{10}$)
Fonte: autoria própria

Figura 18 – Curva analítica para análise de glifosato (matriz ÁGUA).

Escala ($\log_{10}$)
Fonte: autoria própria

Figura 19 – Curva analítica para análise de glifosato (matriz LATOSSOLO VERMELHO).

Fonte: autoria própria

Figura 20 – Curva analítica para análise de glifosato (matriz SEDIMENTO).

Fonte: autoria própria

Figura 21 – Curva analítica para análise de AMPA (EQUIPAMENTO – CG-EM).

Escala ($\log_{10}$)
Fonte: autoria própria

Figura 22 – Curva analítica para análise de AMPA (matriz ÁGUA).

Escala ($\log_{10}$)
Fonte: autoria própria

Figura 23 – Curva analítica para análise de AMPA (matriz LATOSSOLO VERMELHO).

Fonte: autoria própria

Figura 24 – Curva analítica para análise de AMPA (matriz SEDIMENTO).

Fonte: autoria própria

Foram determinadas quatro curvas distintas. A primeira delas foi construída a fim de verificar qual o limite mínimo que o equipamento consegue detectar o herbicida e seu metabólito. Para esta curva, os limites de detecção e quantificação para análise de glifosato foram, respectivamente, de 6,42 e 21,40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para análise de AMPA, os limites foram, respectivamente, de 6,61 e 22,05 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As outras três curvas foram determinadas em três matrizes diferentes: água, latossolo vermelho e sedimento. Essa divisão foi necessária, pois em matrizes complexas, a presença de interferentes e outros compostos naturalmente presentes causam alterações na recuperação e na sensibilidade do método. Para glifosato, os limites para latossolo vermelho foram de 0,001 e 0,035 mg kg^{-1} , respectivamente; para AMPA, 0,017 e 0,057 mg kg^{-1} , respectivamente.

Para sedimento, a curva para glifosato apresenta limites de 0,011 e 0,036 mg kg^{-1} , respectivamente. A curva de AMPA apresenta limites de 0,015 e 0,050 mg kg^{-1} . Já para água, os limites para glifosato foram de 8,18 e 27,25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para AMPA, os limites foram de 10,70 e 35,68 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A Tabela 17 apresenta o resumo dos limites de detecção e quantificação obtidos para os dois analitos.

Tabela 12 – Limites de detecção e quantificação para glifosato e AMPA obtidos para diferentes matrizes

GLIFOSATO				
	equipamento	água	solo	sedimento
LD	6,42 $\mu\text{g L}^{-1}$	8,18 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,001 mg kg^{-1}	0,011 mg kg^{-1}
LQ	21,40 $\mu\text{g L}^{-1}$	27,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,035 mg kg^{-1}	0,036 mg kg^{-1}
AMPA				
	equipamento	água	solo	sedimento
LQ	6,61 $\mu\text{g L}^{-1}$	10,70 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,017 mg kg^{-1}	0,015 mg kg^{-1}
LD	22,05 $\mu\text{g L}^{-1}$	35,68 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,057 mg kg^{-1}	0,050 mg kg^{-1}

Fonte: autoria própria

Para solos, não há legislação brasileira que estabeleça valores máximos permitidos de qualquer pesticida. Já para água, a resolução do Ministério da Saúde MS 2914, que regulamenta valores máximos permitidos em água para consumo humano, estabelece que o valor máximo permitido para glifosato e AMPA é de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, logo, os limites de detecção e quantificação obtidos para a matriz água conseguem atender a esta legislação. [70]

Para glifosato e AMPA, também vale o que já foi discutido sobre a deltametrina; os limites foram calculados de maneira empírica. Nos ensaios de exatidão, através dos valores de recuperação do método, é possível perceber se esses valores teóricos são diferentes ou não dos limites reais.

2.4.5 Precisão

2.4.5.1 Deltametrina

A precisão foi determinada pela análise de amostras de água e latossolo vermelho fortificadas em três concentrações distintas e seus resultados foram obtidos por analistas diferentes. A Tabela 13 mostram os resultados da avaliação.

Tabela 13 – Avaliação da precisão do método de análise para deltametrina em três concentrações distintas – matrizes água e latossolo vermelho.

ÁGUA	
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coeficiente de variação (%)
5	1,54
75	1,82
200	0,84
LATOSSOLO VERMELHO	
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Coeficiente de variação (%)
0,025	8,88
0,05	4,29
0,1	6,27

Fonte: autoria própria

Como os coeficientes de variação apresentaram valores menores que 15%, o método proposto para análise de deltametrina foi considerado preciso.

2.4.5.2 Glifosato e AMPA

A precisão foi determinada pela análise de amostras de água fortificadas em três concentrações distintas e seus resultados foram obtidos por analistas diferentes. As Tabelas 14 e 15 mostram o resultado das avaliações para glifosato e AMPA respectivamente.

Tabela 14 – Avaliação da precisão do método de análise para glifosato em três concentrações distintas – matrizes água e latossolo vermelho

ÁGUA	
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coeficiente de variação (%)
30	4,28
100	1,20
400	0,98
LATOSSOLO VERMELHO	
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Coeficiente de variação (%)
0,075	12,83
0,1	7,19
0,2	9,39

Fonte: autoria própria

Tabela 15 – Avaliação da precisão do método de análise para AMPA em três concentrações distintas – matrizes água e latossolo vermelho

ÁGUA	
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coeficiente de variação (%)
50	1,99
100	0,94
400	4,03
LATOSSOLO VERMELHO	
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Coeficiente de variação (%)
0,075	10,42
0,1	5,08
0,2	8,53

Fonte: autoria própria

Como os coeficientes de variação apresentaram valores menores que 15%, o método proposto para análise de glifosato e AMPA foi considerado preciso.

2.4.6 Exatidão

2.4.6.1 Deltametrina

A Tabela 16 mostra o resultado da exatidão intracorridas para a determinação de deltametrina em matrizes ambientais. A Tabela 17 mostra o resultado da exatidão intercorridas.

Tabela 16 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intracorridas do método de análise de deltametrina em água e latossolo vermelho.

ÁGUA			
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
1	77,0	22,77	não
3	80,3	19,45	não
20	85,9	13,84	sim
100	92,3	7,42	sim
150	101,4	1,72	sim
300	92,1	7,62	sim
LATOSSOLO VERMELHO			
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
0,0125	78,7	21,06	não
0,0375	81,3	18,45	não
0,050	86,9	12,84	sim
0,075	86,2	13,54	sim
0,2	95,8	3,91	sim

* para $X_v = 99,7\%$

Fonte: autoria própria

Tabela 17 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intercorridas do método de análise de deltametrina em água e latossolo vermelho.

ÁGUA			
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
1	71,6	28,18	não
3	82,1	17,65	não
20	87,4	12,33	sim
100	91,8	7,92	sim
150	96,6	3,11	sim
300	96,1	3,61	sim
LATOSSOLO VERMELHO			
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
0,0125	68,3	31,49	não
0,0375	73,8	25,98	não
0,050	85,6	14,14	sim
0,075	86,2	13,54	sim
0,2	91,4	8,32	sim

* para $X_v = 99,7\%$

Fonte: autoria própria

O limite de quantificação (LQ) obtido empiricamente para deltametrina, descrito em 2.4.4.1 em água foi de $14,52 \mu\text{g L}^{-1}$ e o método mostrou-se exato (tanto intra quanto intercorridas) ao avaliar concentrações próximas a esse limite, porém o mesmo não ocorreu com o ensaio em latossolo vermelho. O LQ determinado empiricamente foi de $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$, porém, quando se analisa a exatidão neste ponto, o método mostrou-se não exato para os dois tipos de exatidão (intra e intercorridas). O método começou a apresentar exatidão a partir de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, ou seja, abaixo desse limite, o método não pode ser utilizado.

2.4.6.2 Glifosato e AMPA

As Tabelas 18 e 19 apresentam os resultados da exatidão intracorridas para a determinação de glifosato e AMPA em matrizes ambientais respectivamente. As Tabelas 20 e 21 apresentam os resultados da exatidão intercorridas para os mesmos xenobióticos.

Tabela 18 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intracorridas do método de análise de glifosato em água e latossolo vermelho.

ÁGUA			
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
1	79,0	21,76	não
3	81,3	18,45	não
30	84,9	14,94	sim
300	92,3	7,42	sim
450	91,4	8,32	sim
700	76,7	23,07	não
LATOSSOLO VERMELHO			
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
0,0125	75,1	24,67	não
0,0375	77,3	22,46	não
0,150	86,9	12,83	sim
0,225	86,3	13,44	sim
0,5	85,8	13,94	sim

* para $X_v = 99,7\%$

Fonte: autoria própria

Tabela 19 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intracorridas do método de análise de AMPA em água e latossolo vermelho.

ÁGUA			
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
1	66,4	33,40	não
3	80,4	19,35	não
50	90,0	9,73	sim
300	88,2	11,53	sim
450	98,6	1,10	sim
700	150,8	51,25	não
LATOSSOLO VERMELHO			
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
0,0125	77,4	22,36	não
0,0375	77,9	21,87	não
0,150	90,5	9,23	sim
0,225	89,5	10,23	sim
0,5	95,7	4,01	sim

* para $X_v = 99,7\%$

Fonte: autoria própria

Tabela 20 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intercorridas do método de análise de glifosato em água e latossolo vermelho.

ÁGUA			
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
1	68,2	31,59	não
3	82,3	17,45	não
30	87,1	12,64	sim
300	97,3	2,40	sim
450	94,2	5,51	sim
700	83,7	16,05	sim
LATOSSOLO VERMELHO			
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
0,0125	73,1	26,68	não
0,0375	79,4	20,36	não
0,150	86,7	13,04	sim
0,225	101,3	1,60	sim
0,5	99,8	0,10	sim

* para $X_v = 99,7\%$

Fonte: autoria própria

Tabela 21 – Resultados das recuperações para determinação da exatidão intercorridas do método de análise de AMPA em água e latossolo vermelho.

ÁGUA			
Concentração avaliada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
1	61,8	38,01	não
3	80,2	19,56	não
50	93,7	6,02	sim
300	89,2	10,53	sim
450	92,6	7,12	sim
700	122,7	23,07	não
LATOSSOLO VERMELHO			
Concentração avaliada (mg kg^{-1})	Recuperação obtida (%)	Erro Relativo* (ER) (%)	EXATIDÃO
0,0125	73,4	26,38	não
0,0375	79,1	20,66	não
0,150	88,5	11,23	sim
0,225	93,5	6,22	sim
0,5	94,9	4,81	sim

* para $X_v = 99,7\%$

Fonte: autoria própria

Os resultados de exatidão para glifosato e AMPA mostram que, para as análises de água, a partir de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ o método mostra-se exato, resultado semelhante ao obtido pelo cálculo do limite de quantificação (LQ) empírico descrito em 2.4.4.2 ($27,25 \mu\text{g L}^{-1}$). Nota-se também que há um limite para essa exatidão; o método não mostrou-se exato para $700 \mu\text{g L}^{-1}$ (a curva proposta vai até $600 \mu\text{g L}^{-1}$). De acordo com a MS 2914, o VMP para a soma de glifosato e AMPA é de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, logo o resultado não compromete a eficiência do método. [70] Para as análises de latossolo vermelho, observou-se o mesmo comportamento já discutido com para a deltametrina. Os resultados de exatidão no LQ obtido empiricamente ($0,035 \text{ mg kg}^{-1}$) mostraram-se não exatos, ou seja, o valor real para o LQ é maior que empírico. Abaixo deste valor, o método não pode ser utilizado.

Para o AMPA, os resultados apresentaram o mesmo comportamento.

Com estes resultados é importante destacar a importância de se realizar o teste de exatidão com as concentrações próximas ao LQ, pois a prática pode não corresponder ao que se encontra nas determinações empíricas.

2.4.7 Robustez para deltametrina

A determinação da robustez foi realizada através do Teste de Youden. Neste estudo foram avaliados cinco (5) fatores que afetam a robustez do método para análise de deltametrina por CLAE-UV, conforme o item 2.3.7.7. A Figura 25 mostra o grau de variação de cada fator analisado pela robustez.

Figura 25 – Influência dos cinco fatores (tempo de extração (A), solvente extrator (B), método de extração (C), fluxo da fase móvel (D) e composição da fase móvel (E)) no teste de robustez de acordo com o teste de Youden.

Com a análise da figura, percebe-se que o parâmetro que tem mais influência na robustez do método para deltametrina é o fluxo da fase móvel (parâmetro D). Esse fator tem relação direta com a interação dos analitos na coluna. No caso, um fluxo mais baixo fez com que a interação do analito com a fase estacionária fosse menos eficiente, comprometendo o resultado.

O método de extração (ultrassom ou micro-ondas – parâmetro B), por sua vez, foi o parâmetro que apresentou menor influência na robustez. Como foi apresentado no item 2.4.1.3, os resultados de recuperação foram parecidos em ambas as extrações e isso também se refletiu nos resultados de robustez.

2.4.8 Análise de amostras reais

Foi realizada a caracterização físico-química das amostras coletadas e os resultados são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Caracterização química das amostras de água, solo e sedimento coletadas para a análise de deltametrina, glifosato e AMPA.

Ponto coletado	Matriz	pH	Matéria Orgânica (%)	Carbono (%)	Fósforo (%)	NKT (%)
01	Água	6,98	0,01	nd*	0,022	$3,86 \times 10^{-4}$
	Solo	6,13	3,55	1,96	0,004	$5,51 \times 10^{-4}$
	Sedimento	6,35	1,10	0,61	0,022	$4,96 \times 10^{-4}$
02	Água	6,99	0,02	nd*	0,019	$4,04 \times 10^{-4}$
	Solo	5,75	9,69	5,41	0,008	$1,10 \times 10^{-3}$
	Sedimento	6,25	2,14	1,00	0,015	$7,53 \times 10^{-4}$

* resultado em mg L^{-1}

Fonte: autoria própria

2.4.8.1 Deltametrina

Para a determinação de deltametrina, as amostras coletadas foram analisadas em duas etapas para melhor fidelização dos resultados: cada amostra foi analisada duas vezes; na primeira, as amostras foram fortificadas com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ e na segunda, não houve qualquer adição de padrão. Para a três matrizes foi usada a mesma concentração de fortificação.

As amostras de água coletadas nos dois pontos da propriedade não apresentaram detecção para deltametrina, conforme ilustrado nas Figuras 26 e 27.

Figura 26 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de água – PONTO 01. Nota-se que somente na amostra fortificada com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ detectou-se a presença do piretróide.

Fonte: autoria própria

Figura 27 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de água – PONTO 02. Nota-se que somente na amostra fortificada com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ detectou-se a presença do piretróide.

Fonte: autoria própria

As amostras de solo, por sua vez, o Ponto 01 apresentou traços de deltametrina, na concentração teórica de $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$, ou seja, no limite de quantificação do método proposto. Como os resultados de exatidão (item 2.4.6.1) mostraram que nesta concentração o método não é exato, se pode afirmar apenas que houve detecção do xenobiótico na amostra. A Figura 28 mostra o cromatograma obtido para esta análise.

Figura 28 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de latossolo vermelho – PONTO 01. A amostra possui traços do piretróide.

Fonte: autoria própria

O Ponto 02 apresentou traços de deltametrina, na concentração de $0,09 \text{ mg kg}^{-1}$. Neste caso, pode-se afirmar que esta é a concentração encontrada na amostra, pois o método mostra-se exato a partir de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$. A Figura 29 mostra o cromatograma obtido para esta análise.

Figura 29 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de latossolo vermelho – PONTO 02. A amostra possui traços do piretróide.

Fonte: autoria própria

As amostras de sedimento dos Pontos 01 e 02 não apresentaram traços de deltametrina. As Figuras 30 e 31 mostram os cromatogramas obtidos para estas análises.

Figura 30 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de sedimento. Não foi detectado traços do piretróide na amostra.

Fonte: autoria própria

Figura 31 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de deltametrina em amostra de sedimento – PONTO 2. Não foi detectado traços do piretróide na amostra.

Fonte: autoria própria

Como a solubilidade da deltametrina é baixa em água, já era esperado que não se encontrassem traços do piretróide nas amostras de água. No que diz respeito às análises de solo e sedimento, não é possível discutir se os resultados encontrados representam contaminação para as matrizes visto que não há legislação nacional que contemple valores máximos permitidos para o piretróide.

2.4.8.2 Glifosato e AMPA

Para a determinação de glifosato e AMPA as amostras coletadas também foram analisadas em duas etapas para melhor fidelização dos resultados: para as amostras de água, cada amostra foi analisada duas vezes; na primeira, as amostras foram fortificadas com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ e na segunda, não houve qualquer adição de padrão. As amostras de solo e sedimento, por sua vez, receberam fortificação de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

As amostras de água coletadas nos dois pontos da propriedade não apresentaram detecção para glifosato e AMPA, conforme apresentado nas Figuras 32 e 33.

Figura 32 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de água – PONTO 01. Nota-se que somente na amostra fortificada com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.

Fonte: autoria própria

Figura 33 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de água – PONTO 02. Nota-se que somente na amostra fortificada com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.

Fonte: autoria própria

Nas amostras de solo, em ambos os pontos também não houve traços de glifosato e AMPA, conforme apresentado nas Figuras 34 e 35.

Figura 34 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de latossolo vermelho – PONTO 01. Nota-se que somente na amostra fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.

Fonte: autoria própria

Figura 35 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de latossolo vermelho – PONTO 02. Nota-se que somente na amostra fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.

Fonte: autoria própria

Já nas amostras de sedimento, no Ponto 01 não houve traços de glifosato e AMPA, mas no Ponto 02 foi detectado AMPA na concentração teórica de $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$. Como o ensaio de exatidão mostrou que concentrações abaixo de $0,0375 \text{ mg kg}^{-1}$ não possuem exatidão, não se pode afirmar a real concentração do pico encontrado. As Figuras 36 e 37 apresentam os cromatogramas para análise de sedimento.

Figura 36 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de sedimento – PONTO 01. Nota-se que somente na amostra fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ detectou-se a presença do herbicida e seu metabólito.

Fonte: autoria própria

Figura 37 – Cromatograma obtido para a avaliação da presença de glifosato e AMPA em amostra de sedimento – PONTO 02. A amostra possui traços de AMPA.

A ausência de glifosato e AMPA em solo já era esperada, pois a solubilidade dos mesmos em água é muito alta. A presença de traços de AMPA em sedimento pode estar relacionada a alguma contaminação pontual, já que há registro de uso do herbicida em propriedades vizinhas e resíduos deste (e de AMPA) não foram encontrados nas demais amostras.

2.5 Conclusões

O método proposto para análise de deltametrina, glifosato e AMPA mostrou-se adequado em relação aos parâmetros analisados e à legislação brasileira, logo é possível realizar estudos de contaminação de água, solo e sedimento usando essa metodologia.

As amostras coletadas em propriedade rural da cidade de São Carlos apresentaram contaminação pontual em apenas uma amostra de sedimento, e como não há legislação que regulamente o uso de pesticidas para solo e sedimentos, não é possível afirmar se a concentração encontrada apresenta potencial efeito tóxico.

Para trabalhos futuros, é preciso realizar monitoramento mais amplo pelo município, bem como a micro e macro regiões a fim de se ter um mapeamento mais condizente com a realidade do uso de deltametrina e glifosato no ambiente.

Capítulo III

Estudos de sorção de deltametrina, glifosato e AMPA em latossolo vermelho

3.1 Introdução

O solo é constituído de quatro fases: fase inorgânica, orgânica, líquida e gasosa, sendo que a fração sólida do solo, a mais importante nos processos de sorção, contém argilas minerais e matéria orgânica. [71]

A mobilidade de poluentes orgânicos no solo é bastante complexa e é resultante de vários fatores, tais como a estrutura química do poluente em questão e a interação com os constituintes das diferentes frações contidas no solo (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, humina, argila, óxidos e etc.). Esse comportamento pode ser influenciado por alguns fatores tais como: adsorção, dessorção, volatilização, lixiviação, transporte e decomposição. Destes, a adsorção/dessorção é um dos processos principais que regulam a concentração de um contaminante no solo e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. [25], [41], [72]–[74]

Saber se a adsorção inibe ou a dessorção aumenta a biodisponibilidade de um contaminante é de grande importância para uma melhor previsão de sua mobilidade nos diferentes compartimentos ambientais para onde ele pode migrar, prevendo assim seu possível destino e efeitos ecológicos. De maneira geral, acredita-se que a sorção de contaminantes para o solo/sedimento reduz a sua biodisponibilidade. [74]

A adsorção é a interação do soluto (poluente orgânico) da fase líquida com a superfície das partículas da fração sólida do solo. É um processo determinante para se entender o comportamento de herbicidas, pois está relacionado diretamente aos processos de transporte e bioatividade deste no solo, influenciando diretamente na disponibilidade dos compostos para as plantas e na ação seletiva dos herbicidas pela interferência no seu deslocamento. A dessorção refere-se ao processo inverso. [41], [73], [75]

3.1.1 O conceito de sorção

Calvet (1989) afirma que, de acordo com IUPAC, o fenômeno de sorção é descrito como o enriquecimento de uma ou mais espécies químicas em uma determinada interface. Quando essa interface é o solo, a sorção é a passagem

de um soluto da fase aquosa para a superfície de um adsorvente sólido e a dessorção é o processo reverso. O soluto pode ser uma molécula neutra ou uma espécie iônica e o processo pode acontecer nos macro ou nos microporos. [76], [77]

No processo de sorção, as moléculas presentes na fase fluida são atraídas para a zona interfacial devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente. O fenômeno de sorção decorre da partição dos compostos entre as fases sólidas e a solução do solo, sendo dependente das propriedades físico-químicas dos colóides do solo e do composto. [78]

A sorção pode ser classificada como química ou quimissorção, em que estão envolvidas altas energias de ativação do processo com transformação dos compostos e ligações fortes, e/ou sorção física (fiossorção), cujas energias são mais baixas e a natureza química das espécies envolvidas são preservadas. As forças envolvidas na sorção física incluem as forças de van der Waals (repulsão e dispersão) e interações eletrostáticas compreendendo as interações de polarização, dipolo e quadrupolo. [78]

A interação de um poluente orgânico com o solo geralmente é classificada como sorção física. Ela ocorre por uma diferença de energia e/ou forças de atração que tornam as moléculas fisicamente presas ao sólido. Estas interações têm um longo alcance, porém são fracas. A energia produzida quando uma partícula é fisicamente adsorvida é da mesma ordem da entalpia de condensação. O equilíbrio é estabelecido rapidamente, a menos que ocorra a difusão através da estrutura porosa. [78]

Assim, nas vizinhanças da superfície do adsorvente ocorre uma mudança das propriedades da fase fluida, sendo esta região tratada como uma fase termodinamicamente diferente. Pode-se considerar esta camada interfacial como sendo composta pela camada da superfície do adsorvente, chamada simplesmente de superfície do adsorvente, e o espaço de sorção no qual o enriquecimento do adsorvivo pode ocorrer. Sendo assim, podemos definir a sorção física como aquela que ocorre quando as forças intermoleculares de atração das moléculas na fase fluida e da superfície sólida são maiores que as forças atrativas entre as moléculas do próprio fluido. [78]

3.1.2 Mecanismos de sorção

3.1.2.1 Sorção em argilas

As argilas são definidas como materiais naturais, terrosos, de granulação fina que, quando umedecidos com água, apresentam plasticidade. De modo geral, as argilas se referem às partículas do solo que possuem diâmetro inferior a 2,0 μm e das quais podem fazer parte diferentes tipos de minerais: silicatos lamelares de magnésio e de alumínio, quartzo, feldspato, carbonatos, óxidos metálicos e até mesmo matéria orgânica. [79]

Estruturalmente, as argilas possuem lamelas cristalinas nanométricas bidimensionais empilhadas, como um baralho de cartas. As lamelas têm pouco menos que 1,0 nm de espessura e poucas centenas de nanômetros de diâmetro médio. Cada lamela é formada pelo arranjo de dois tipos de folhas cristalinas, com estrutura octaédrica ou tetraédrica. Os diferentes grupos de argilas são definidos de acordo com a maneira com que as folhas tetraédricas e octaédricas se arranjam, formando as lamelas: 1:1 – na qual apenas uma folha tetraédrica está ligada a uma folha octaédrica; e 2:1 – na qual uma folha octaédrica está ensanduichada no meio de duas folhas tetraédricas. O tipo mais comum e abundante de argila é a caulinita, 1:1. Entre as argilas 2:1, a montmorilonita está entre as mais abundantes e tecnologicamente relevantes. [79]

As argilas podem desempenhar papel importante na sorção de pesticidas, principalmente os polares, ou seja, aqueles que apresentam grupos funcionais reativos (carboxilas, hidroxilas, fenilas, aminas ou amidas, por exemplo), sobretudo em decorrência da elevada superfície específica desses minerais. [80]

Alguns tipos de argilas apresentam maior capacidade de troca catiônica e maior área superficial específica. A caulinita, predominante em solos brasileiros, possui balanço de carga negativo para valores de pH maiores que 4,0. Essas propriedades originam forças de atração de grande intensidade, contribuindo significativamente para o aumento da capacidade de sorção de alguns pesticidas, considerando o teor e tipo de argila dos solos. [80]

Para solos argilosos, é preciso usar uma maior dosagem de pesticida do que para solos arenosos, o que mostra que, quanto maior o teor de argila no solo, maior a sorção dos pesticidas às partículas do solo e, conseqüentemente, menor sua disponibilidade para exercer sua ação biológica. [80] Isso é válido se os solos estudados tiverem teor de matéria orgânica semelhantes. Caso contrário, ela passa a ter influência na sorção.

A seguir são apresentadas três formas de sorção em que as argilas tem papel fundamental.

3.1.2.1.1 Troca de ligantes

Refere-se à reação em que o ligante de um íon complexado é trocado por outro diferente. Neste caso, íon complexado compreende um íon metálico central circundado por outras moléculas ou íons (por exemplo: H_2O , NH_3 e Cl^-), que estão unidos ao íon central por meio de ligação covalente dativa. No solo, a troca envolve o deslocamento de ligantes relativamente fracos associados à estrutura molecular de partículas de solo, como as moléculas de água de hidratação de alguns cátions polivalentes, principalmente Al e Fe associados à matéria orgânica do solo. [80]

As principais fontes de sítios de sorção no solo, que envolvem mecanismos específicos para os pesticidas aniônicos (com caráter ácido), são os óxidos de Fe e Al da fração argila, além daqueles associados à matéria orgânica do solo (MOS), tornando-se o balanço de cargas de sua superfície mais positivo à medida que o pH diminui. A formação de sítios neutros ou positivos na superfície de solos tropicais altamente intemperizados, ricos em óxidos de Fe e Al, quando em valores baixos de pH, favorece o enfraquecimento das ligações oxigênio-Fe ou oxigênio-Al pela diminuição na densidade de elétrons da ligação. [80]

3.1.2.1.2 Ligação Iônica

A ligação iônica resulta da atração de íons ou moléculas iônicas cujos grupos funcionais apresentam cargas opostas. Normalmente, as ligações iônicas envolvem os grupos carboxílicos e fenólicos ionizados ou facilmente

ionizáveis da matéria orgânica do solo e/ou, grupos hidroxilas dos minerais de argila, que apresentam cargas negativas após dissociação em condições naturais de acidez, e os pesticidas catiônicos ou aqueles com caráter básico, isto é, com grupos funcionais ionizáveis à forma catiônica, como o grupo amina ($-NH_2$). [80]

Ligação iônica também pode ocorrer entre as moléculas aniônicas de pesticidas ácidos, que contenham principalmente grupos carboxílicos e fenólicos, e os sítios com cargas positivas dos óxidos de Fe e Al, usualmente encontrados em solos tropicais altamente intemperizados. [80]

3.1.2.1.3 Ligação de hidrogênio

A ligação de hidrogênio envolve forças de atração intermoleculares, na qual um átomo de hidrogênio é atraído a dois átomos pequenos, fortemente eletronegativos que contêm pares de elétrons não-ligantes (isolados), principalmente N, O ou F. As substâncias húmicas (SH), assim como os minerais de argila, com seus inúmeros radicais contendo oxigênio ($-O$) e hidroxilas ($-OH$), podem formar ligações de hidrogênio com os radicais complementares dos pesticidas. A ligação de H constitui importante mecanismo de sorção para vários pesticidas que apresentam polaridade, mas não são ionizáveis (como exemplo, a uréia). [80]

3.1.2.2 Sorção em matéria orgânica

A matéria orgânica tem papel fundamental no que diz respeito ao desempenho dos pesticidas no solo. As SH, a principal fração da matéria orgânica que atua na retenção e na biodisponibilidade de macro e micro nutrientes, além de atuar diretamente na sorção de compostos orgânicos em solo, são constituídas de materiais não vivos naturais e ocorrem em todos os ambientes terrestres e aquáticos. As principais frações das substâncias húmicas, os ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH), apresentam natureza polidispersa e caráter polieletrólítico, propriedades de atividade de superfície e a presença de vários grupos funcionais quimicamente reativos, porções de alta reatividade, e sítios hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura molecular, que

qualifica estas substâncias como privilegiadas na interação com pesticidas orgânicos. [81]

As substâncias húmicas podem interagir com pesticidas de vários modos, incluindo adsorção, particionamento e solubilização, desalquilação, e fotossensibilização. Todos estes processos têm implicações evidentes no destino e comportamento de agrotóxicos no sistema solo, afetando a sua degradação e desintoxicação, a persistência de resíduos e de monitoramento, mobilização e transporte, biodisponibilidade e fitotoxicidade, e bioacumulação. Fenômenos de adsorção representam provavelmente o modo mais importante da interação entre substâncias húmicas e pesticidas e controlar a concentração dos últimos na fase líquida do solo. Os processos de adsorção podem variar de reversibilidade completa a irreversibilidade total, isto é, uma vez adsorvido, pode ser facilmente dessorvido em vários níveis, ou não. O grau de adsorção depende da quantidade de ambos, da SH e do pesticida e suas propriedades, que incluem o tamanho, a forma, a configuração, a estrutura molecular, uma função química, solubilidade, polaridade, polarizabilidade e distribuição de cargas de espécies que interagem, e o caráter ácido ou básico da molécula. [81]

3.1.2.2.1 Ligação iônica

Adsorção via ligação iônica, ou de troca catiônica, se aplica apenas aos pesticidas que estão na forma catiônica em solução ou que podem aceitar um próton. Esse tipo de interação ocorre principalmente entre os íons carboxílico e grupos hidroxila fenólica das SH. [81]

3.1.2.2.2 Ligação de hidrogênio

A presença de numerosos átomos de oxigênio e grupos hidroxila como grupos funcionais nas SH torna altamente provável a formação de ligações de hidrogênio com pesticidas que contêm grupamentos complementares adequados. Esse tipo de ligação também pode ocorrer com as moléculas de água presentes no meio reacional. [81]

3.1.2.2.3 Transferência de carga

A presença de estruturas deficientes em elétrons nas SH, tais como quinonas, sugerem a possível formação de complexos de transferência de carga, por meio de mecanismos de doação-recepção de elétrons. [81]

3.1.2.2.4 Ligação covalente

A ligação covalente é uma ligação que tem por característica o compartilhamento de elétrons entre átomos de moléculas diferentes, com eletronegatividades semelhantes. [81]

3.1.2.2.5 Forças de Van der Waals

As forças de Van der Waals consistem em interações fracas, do tipo dipolo instantâneo-dipolo induzido, que operam em todas as interações adsorvente-adsorbato. As forças de Van der Waals assumem particular importância na adsorção de pesticidas não-iônicos e não-polares em locais específicos nas moléculas de AH. [81]

3.1.2.2.6 Troca de ligantes

Adsorção pelo mecanismo de troca de ligantes envolve a substituição da água de hidratação ou outros ligantes fracos que prendem parcialmente cátions polivalentes associadas ao solo por moléculas adsorventes. [81]

3.1.2.2.7 Adsorção hidrofóbica e particionamento

A adsorção hidrofóbica é proposta como um mecanismo independente do pH para a retenção por sítios ativos hidrofóbicos de SH de pesticidas não-polares que interagem fracamente com a água e para o qual as moléculas de água não são bons concorrentes. Estes locais incluem cadeias laterais alifáticas ou porções lipídicas e porções derivados da lignina com elevado teor de carbono e um pequeno número de grupos polares das macromoléculas SH.

A retenção hidrofóbica não precisa ser um mecanismo de adsorção ativa; pode ser considerada como uma partição entre um solvente e uma superfície não específica. Esta interação é modelada como uma reação de equilíbrio, semelhante à partição entre dois solventes imiscíveis, tais como água e octanol. [81]

3.1.3 Isotermas de sorção

A sorção de poluentes orgânicos no solo é um processo ambientalmente importante cuja afinidade é expressa por uma constante. [82]

Vários modelos matemáticos de isoterma que descrevem a relação de adsorção para um pesticida no solo e seus constituintes são discutidos na literatura. O modelo de Freundlich é usado em sistemas onde a adsorção ocorre em superfícies heterogêneas (no caso, solo). [76]

A forma da equação de Freundlich é apresentada na Equação 6:

$$x/m = K_f \times C_e^{1/n} \quad (6)$$

na qual K_f é a constante de Freundlich e $1/n$ uma constante (índice da intensidade da adsorção) que depende da substância adsorvida e do meio adsorvente.

Tanto K_f como $1/n$ são parâmetros de regressão característicos para cada sistema solo-xenobiótico. O parâmetro x representa o volume da solução do poluente adicionado (mL) e m é a massa do solo (g), C_e é a concentração do poluente no equilíbrio com o solo (mg L^{-1}).

3.1.4 Classificação das isotermas

As isotermas de sorção são divididas em quatro principais classes, de acordo com sua inclinação inicial. As quatro classes foram nomeadas de isotermas do tipo S ("Spherical"), L ("Langmuir"), H ("High affinity") e C ("Constant partition"), conforme apresentadas na Figura 38. [76], [83]

Figura 38 – Classificação das isotermas de sorção.

Fonte: CALVET (1989). [76]

3.1.4.1 Isotermas do tipo S

A sorção inicial é baixa e aumenta à medida que o número de moléculas adsorvidas aumenta, o que mostra que houve uma associação entre moléculas chamada de sorção cooperativa. [76], [83]

3.1.4.2 Isotermas do tipo L

A forma L possui inclinação não linear e côncava em relação à abcissa.

Nesse caso, há uma diminuição da disponibilidade dos sítios de sorção quando a concentração da solução aumenta. [76], [83]

3.1.4.3 Isotermas do tipo H

Trata-se de um caso especial de curva do tipo L e é observada quando a superfície do adsorvente possui alta afinidade pelo soluto adsorvido. [76], [83]

3.1.4.4 Isotermas do tipo C

Corresponde a uma partição constante do soluto entre a solução e o adsorvente, dando à curva um aspecto linear. As condições que favorecem as curvas do tipo C são substratos porosos flexíveis e regiões de diferentes graus de solubilidade para o soluto. As isotermas do tipo C e L são muito próximas, podendo ser, em muitos casos, consideradas do mesmo tipo. [76], [83]

3.1.5 Potencial de lixiviação

O sistema de produção agrícola adotado nos últimos 20 anos tem sido altamente dependente do uso de agroquímicos (agrotóxicos, fertilizantes e outros insumos) para assegurar produtividade, expondo os recursos hídricos ao aporte de agrotóxicos aplicados nas culturas para áreas não alvo e, assim, expondo o ambiente como um todo a risco de contaminações. [84]

Como já dito, o comportamento do agrotóxico no ambiente é orientado basicamente pelos processos de retenção, de transformação e de transporte.

Os principais processos que favorecem o transporte de agrotóxicos são volatilização, lixiviação, escoamento superficial (ou “run-off”) e evaporação. [84]

Muitos pesquisadores têm proposto métodos de seleção para verificar se determinado pesticida apresenta possibilidade de lixiviar. Há modelos propondo limites para uma propriedade física ou conjunto de propriedades que, quando excedidos, indicariam que o pesticida apresenta potencial de lixiviação ou então modelos analíticos ou numéricos muito simples, no sentido de prever a possibilidade de lixiviação. [85]

Por muitos anos, a mobilidade dos pesticidas foi identificada como característica chave na avaliação do potencial de lixiviação exigindo o uso de mecanismos como o coeficiente de sorção para ordenar o potencial de mobilidade de pesticidas no solo. Entretanto, a mobilidade por si só não constitui bom indicador de lixiviação e de potencial de contaminação de água subterrânea. A combinação mobilidade/persistência é que determina se o composto será degradado durante seu tempo de permanência no solo. [85]

Como alternativa para simplificar índices de mobilidade, é recomendado o uso de modelo que inclua a influência de mobilidade e a meia-vida na

avaliação do potencial de lixiviação. Um índice bastante utilizado para elucidar esse potencial é um modelo matemático conhecido como índice de GUS, que é reconhecido internacionalmente e será apresentado no item 3.3.5. [84]

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo Geral

Deltametrina, glifosato e ácido aminometilfosfônico podem contaminar águas subterrâneas e solos, provocando sério impacto à cadeia trófica, logo, o estudo da interação destes xenobióticos com o solo é de fundamental importância para se determinar a mobilidade desses compostos no ambiente, a fim de prevenir futuras contaminações, sendo este o objetivo geral deste capítulo.

3.2.2 Objetivos Específicos

Estudar a sorção de deltametrina e glifosato em latossolo vermelho e comparando os resultados aos de solo calcinado.

Prever o potencial de lixiviação da deltametrina e glifosato em latossolo vermelho.

3.3 Experimental

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Vidrarias

Densímetro;
Erlenmeyer (150 mL).

3.3.1.2 Reagentes

Acetonitrila (Panreac, grau HPLC);
Água isenta de orgânicos;
Hexametáfosfato de sódio;
Solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹;
Padrão Deltametrina: Sigma Aldrich (Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze)
Deltamethrin Pestanal®, validade em 23.10.2015;

3.3.1.3 Equipamentos

Jogo de peneiras: 0,05; 4,8; 9,5; 19,0; 25,0; 38,0 e 50,0 mm;
Mufla (EGG 1800);
Mesa Agitadora (Tecnal – TE 140);
Centrífuga (Novatecnica NT810);
CLAE-UV (Shimadzu UFLC 20A).

3.3.1.4 Outros

Filtro de 0,45µm

3.3.2 Coleta e preparo das amostras

O latossolo vermelho utilizado nos estudos de sorção e de toxicidade (Capítulo IV) foi coletado em propriedade rural (21° 56' 6" S 47° 54' 16" O) em área sem histórico de contaminação por xenobióticos. A amostragem procedeu-se conforme o item 2.3.4, no Capítulo II.

O solo foi seco à temperatura ambiente e posteriormente macerado e peneirado (peneira de 2 mesh), sendo, em seguida, armazenado em frasco de vidro limpo, etiquetado e sob abrigo de luz.

Para os estudos com solo calcinado, levaram-se 300 g do solo seco à mufla à 550°C por 4h.

3.3.3 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada a fim de se determinar a porcentagem de argila, silte, areia e pedregulho existentes no solo. Primeiramente, adicionaram-se 100 mL da solução dispersante (45,7 g de hexametáfosfato de sódio em 1 litro de água destilada e mantendo-a em agitação até ocorrer a dissolução completa do reagente) em 20 g da amostra. Em seguida, a amostra com a solução dispersante foi posta em agitação por 16 horas. Após esse procedimento, a suspensão foi passada numa peneira com malha de 0,05 mm. O material retido pela peneira foi lavado e seco em estufa a 100°C até atingir uma massa constante. O filtrado foi colocado em uma proveta de 1000 mL, que foi completada com água destilada.

Na sequência, foi feita a análise de argila e silte. Para isso, agitou-se a mistura presente na proveta até a completa suspensão das partículas, inseriu-se um densímetro na proveta e anotou-se o início da sedimentação. Nos tempos de 0,5, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos realizaram-se medições referentes à temperatura e à densidade. Com os dados obtidos, foram calculados o diâmetro máximo da partícula e o percentual deste particulado na suspensão de acordo com a NBR 7181. [86]

Juntamente às análises de silte e argila, foi feita a análise de areia e pedregulho. As frações de pedregulhos e areias fina, média e grossa foram determinadas utilizando-se o método de peneiramento. Neste método, o

material retido pela peneira de malha 0,05 mm, já seco, é peneirado novamente através de um jogo de peneiras com malhas: 4,8; 9,5; 19,0; 25,0; 38,0 e 50,0 mm. Para auxiliar no peneiramento, o sistema foi colocado em uma mesa agitadora durante dez minutos. A massa retida em cada peneira foi anotada e os percentuais da composição do solo foram calculados. [87]

A análise granulométrica foi realizada no Laboratório de Geotecnia da Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

3.3.4 Sorção de deltametrina e glifosato em latossolo vermelho e em solo calcinado

Os ensaios de sorção foram realizados colocando-se 1,00 g de cada matriz (latossolo vermelho e solo calcinado) em Erlenmeyers de 150 mL e em cada frasco, adicionaram-se 10,0 mL de soluções em diferentes concentrações de deltametrina (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 50,0 mg L⁻¹), tendo solução aquosa de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ como eletrólito-suporte. As amostras contendo as misturas de deltametrina e solo foram submetidas à agitação orbital em uma mesa agitadora por 12 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram retirados cuidadosamente, filtrados em filtro de 0,45 µm e posteriormente determinados por CLAE, com detector UV-Vis, com a metodologia analítica proposta do Capítulo II.

Os ensaios de sorção para glifosato e AMPA foram conduzidos utilizando as mesmas concentrações de soluções (foram preparadas soluções mix de glifosato e AMPA) e seguindo a mesma metodologia já descrita. Os sobrenadantes foram submetidos à procedimento de derivatização e analisados por CG-EM, conforme metodologia proposta no Capítulo II.

Os resultados experimentais obtidos foram submetidos à análise matemática e ajustados segundo as curvas de sorção propostas por Freundlich.

3.3.5 Coeficiente de distribuição (Kd) e coeficiente de distribuição do contaminante na fração orgânica do solo (Koc)

Foram calculados os valores de Kd (constante de distribuição em dada concentração), também conhecida como coeficiente de distribuição, para a comparação da capacidade adsortiva entre o latossolo vermelho e o solo calcinado, conforme a Equação 7.

$$K_d = \frac{x/m}{C_e} \quad (7)$$

Onde: Kd = coeficiente de distribuição (L kg⁻¹);

x/m = quantidade do contaminante sorvida por massa de solo (mg kg⁻¹);

Ce = concentração do xenobiótico na solução em equilíbrio com o solo (mg L⁻¹);

Devido à importância do carbono orgânico presente no solo no processo de sorção e distribuição de compostos orgânicos, o coeficiente de distribuição (Kd) é geralmente expresso por coeficiente de distribuição do contaminante na fração orgânica do solo (Koc) apresentado na Equação 8.

$$K_{oc} = \left(K_d / C \right) \times 1000 \quad (8)$$

Onde: Koc = coeficiente de distribuição normalizado pelo teor de carbono orgânico (L kg⁻¹);

C = teor de carbono orgânico (g kg⁻¹).

3.3.6 Cálculo do potencial de lixiviação

Para a avaliação do potencial de lixiviação da deltametrina e do glifosato, foi utilizado o índice de GUS (Groundwater Ubiquity Score ou índice de

vulnerabilidade de águas subterrâneas), que indica o potencial de lixiviação, a partir dos dados de Koc (coeficiente de adsorção à matéria orgânica) e o tempo de meia-vida do xenobiótico contaminante no solo. O cálculo obedece à Equação 9: [84]

$$GUS = \log(t^{1/2}) \times (4 - \log(Koc)) \quad (9)$$

Onde: $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida do pesticida no solo;

Koc = coeficiente de adsorção na fração orgânica do solo.

Uma vez identificado esse índice, eles obedecem a uma tendência de lixiviação de acordo com o intervalo: [84]

GUS < 1,8: não sofre lixiviação (NL)

1,8 < GUS < 2,8: faixa de transição

GUS > 2,8: provável lixiviação (PL)

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Análise granulométrica

A Tabela 23 apresenta a composição mineral do solo natural utilizado nos testes de sorção e toxicidade envolvendo minhocas *Eisenia foetida* e a Figura 39 apresenta a curva granulométrica desse solo.

Tabela 23 – Composição mineral do solo natural

Composição	
Material	%
Pedregulho grosso	0,0
Pedregulho médio	0,0
Pedregulho fino	0,0
Areia grossa	4,2
Areia média	20,8
Areia fina	35,0
Silte	27,5
Argila	12,5
Σ (%)	100,0

Fonte: autoria própria

Figura 39 – Curva de distribuição granulométrica do solo natural.

Fonte: Laboratório de Geotecnia, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

Pode-se observar que o solo amostrado possui uma granulometria predominantemente arenosa, tendo mais de 60% de areia e uma fração de argila de 12,5%, sendo classificado como contendo areia fina a média siltosa marrom escuro com matéria orgânica. Pode-se esperar que, pela ausência de argilas, a matéria orgânica tenha maior efeito na sorção dos xenobióticos.

3.4.2 Curvas de sorção

Considerando-se que as isotermas de sorção no solo variam fortemente dependendo da estrutura química e composição dos solos, são necessários estudos do comportamento destes compostos orgânicos em solos brasileiros, no caso, deltametrina, glifosato e AMPA, para melhor adequação dos modelos às condições climáticas e ambientais nacionais.

A deltametrina é adsorvida nas partículas sólidas do solo, devido à baixa solubilidade em água ($0,0002 \text{ mg L}^{-1}$, 25°C) e alto coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow} = 4,6$). Ela não lixivia, sofre mineralização desprezível e

degrada-se lentamente, com meia-vida da ordem de 72 dias. No solo, seu tempo de meia-vida é de 30 dias. [27], [88]

As isotermas de adsorção/dessorção para deltametrina estão apresentadas nas Figuras 39 e 40.

Figura 40 – Isotermas de Freundlich para adsorção de deltametrina em solo calcinado e em latossolo vermelho.

Fonte: autoria própria

Figura 41 – Isotermas de Freundlich para dessorção de deltametrina em solo calcinado e latossolo vermelho.

Fonte: autoria própria

Percebe-se que a presença de matéria orgânica contribuiu para a maior retenção do piretróide no solo.

O glifosato, por sua vez, é altamente adsorvido nas partículas sólidas do solo, apresenta alta solubilidade em água ($10,5 \text{ g L}^{-1}$, 25°C a pH 2 e 1050 g L^{-1} a pH 5 – 9) e baixo coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow} = -3,2$). Seu tempo de meia-vida pode variar de 3 a 60 dias dependendo do tipo de solo. [41], [43]

O AMPA tem propriedades semelhantes às do glifosato, devido à sua estrutura química semelhante. Tem alta solubilidade em água (58 g L^{-1} , 20°C , pH 2) e baixo coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow} = -2,36$). Seu tempo de meia-vida é mais longo; pode variar de 119 a 958 dias dependendo do tipo de solo. [42], [47], [89]

As isotermas de adsorção/dessorção para glifosato e AMPA são apresentadas nas Figuras 42 a 45.

Figura 42 – Isotermas de Freundlich para adsorção de glifosato em solo calcinado e latossolo vermelho.

Fonte: autoria própria

Figura 43 – Isotermas de Freundlich para dessorção de glifosato em solo calcinado e latossolo vermelho.

Fonte: autoria própria

Figura 44 – Isotermas de Freundlich para adsorção de AMPA em solo calcinado e latossolo vermelho

Fonte: autoria própria

Figura 45 – Isotermas de Freundlich para dessorção de AMPA em solo calcinado e latossolo vermelho.

Fonte: autoria própria

Percebe-se que a presença de matéria orgânica contribuiu para a maior retenção do herbicida no solo, já que o teor de argilas presentes é baixo.

A Tabela 24 mostra os valores de K_f , $1/n$ e R obtidos para as curvas de adsorção/dessorção de deltametrina, glifosato e AMPA nas duas matrizes (solo calcinado – isento de matéria orgânica – e latossolo vermelho).

Tabela 24 – Resultados de K_f e $1/n$ da adsorção/dessorção de deltametrina, glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em solo calcinado (matriz 1) e em latossolo vermelho (matriz 2).

	Matriz	Adsorção			Dessorção		
		K_f	$1/n$	R	K_f	$1/n$	R
Deltametrina	1	$1,022 \times 10^3$	0,8341	0,9989	$6,468 \times 10^4$	1,554	0,9754
	2	$1,180 \times 10^5$	1,691	0,9918	$2,278 \times 10^{12}$	4,560	0,9877
Glifosato	1	305,37	0,9797	0,9903	301,68	0,409	0,9705
	2	$2,344 \times 10^6$	1,46	0,8998	$1,072 \times 10^6$	1,457	0,9687
AMPA	1	645,60	2,740	0,9937	67,83	1,18	0,9768
	2	$2,036 \times 10^4$	1,581	0,9571	2064,24	0,580	0,9664

Para as condições selecionadas, K_f e $1/n$ são conhecidos como fatores de capacidade e intensidade de adsorção, respectivamente. K_f é a quantidade de pesticida adsorvida quando a concentração no equilíbrio é igual à unidade. O parâmetro $1/n$ indica o grau em que a isoterma de adsorção ou dessorção do pesticida no solo é função da concentração da solução em equilíbrio. [73], [90]

Na presença da matéria orgânica, os contaminantes orgânicos podem promover uma variedade de interações sortivas através de equilíbrio reversível. Esses processos também podem afetar a intensidade de bioatividade e lixiviação por parte destes compostos no ambiente [73].

A adsorção nos colóides do solo, especificamente na fração mineral, para a maioria dos pesticidas envolve diferentes mecanismos, tais como: fixação física, força de Van der Waals, ligação de hidrogênio, ligação iônica, complexação através de íons metálicos, ligação hidrofóbica, complexo de transferência de carga, interações eletrostáticas e ligações covalentes também são possíveis [73].

Pelas informações da Tabela 24, pode-se perceber que a matéria orgânica promoveu um aumento na capacidade de adsorção para todos os xenobióticos estudados. A influência dela frente ao glifosato e ao AMPA, que são moléculas de baixa massa molecular e alta polaridade ficou muito evidente. Quanto à dessorção também se percebe o efeito da matéria orgânica para todos os xenobióticos, quando comparada às argilas. Isso aconteceu, pois,

conforme nos resultados obtidos em 3.4.1, o solo utilizado apresenta 12,5% de argila, ou seja, a maior parte é constituída por areia (60%). Logo, a presença da matéria orgânica passa a ter grande relevância nos processos de sorção dos xenobióticos.

A isoterma de adsorção representa a relação entre a quantidade de um pesticida adsorvido a partir de soluções a várias concentrações e a quantidade remanescente nestas soluções, após determinado período de equilíbrio com um dado solo, à temperatura constante. [90]

Os trabalhos de Ismail e colaboradores (2013) e Oudou e Hansen (2002) afirmam que a interação da deltametrina no solo é do tipo adsorção hidrofóbica, devido ao alto grau apolar de sua molécula. O trabalho de Oudou e Hansen (2002) também afirma que a deltametrina tem interação com sítios argilosos em solos pobres de matéria orgânica, porém, como o solo utilizado para os estudos de sorção é rico em areia, a matéria orgânica passou a ter papel importante da adsorção do piretróide no solo. [91], [92]

Isso pode ser visualizado nos valores de K_f na Tabela 24, a adsorção da deltametrina no solo calcinado (livre de matéria orgânica) foi bem menor que aquela comparada com latossolo vermelho (com presença de matéria orgânica), o que sugere que a capacidade de adsorção da deltametrina aumenta conforme aumenta o teor de matéria orgânica do solo. O mesmo comportamento foi observado para glifosato e AMPA.

Toni e colaboradores (2006) afirmam que glifosato e AMPA adsorvem muito na fração mineral do solo, devido à presença de óxidos e hidróxidos das argilas presentes nele e que a matéria orgânica tem papel secundário, dependendo da quantidade de óxidos de ferro e alumínio. Mas, devido ao baixo teor de argilas no latossolo vermelho estudado, a matéria orgânica teve grande influência na adsorção do glifosato e do AMPA, os quais se ligam às substâncias húmicas através de ligações de hidrogênio formadas entre o grupo fosfato destes xenobióticos e o polímero das substâncias húmicas. [41], [93]

Vale ressaltar que outras propriedades estruturais e estereoquímicas de substâncias húmicas devem também desempenhar um papel na adsorção de glifosato e AMPA. Quanto maior o tamanho molecular das substâncias húmicas, maior é o número de ligações que ocorrem entre o xenobiótico e a molécula húmica, provocando assim sua adsorção. [94], [95]

A isoterma de dessorção representa a relação entre a quantidade de um pesticida ainda remanescente no solo e em outros substratos, após o processo de dessorção, e a quantidade liberada para a solução aquosa, originalmente sem o composto após o equilíbrio a uma dada temperatura. [73], [90]

É de suma importância estudar a dessorção de pesticidas para que se possa quantificar o transporte de compostos orgânicos no solo. [74] Analisando os valores de K_f de dessorção, a deltametrina desorve menos em solo com presença de matéria orgânica, o que comprova que a matéria orgânica do solo causa um grande efeito na interação deltametrina e material adsorvente, promovendo uma menor liberação do composto durante a dessorção. O mesmo comportamento foi observado para glifosato e AMPA. Isso é uma evidência de que a matéria orgânica contribui para um baixo transporte por arraste dos três xenobióticos, ou seja, ela retém os compostos no solo, diminuindo uma possível contaminação dos corpos d'água.

3.4.3 Potencial de lixiviação

Como já mencionado, a sorção de compostos orgânicos varia de acordo com o tipo de solo. Na literatura, encontram-se dados usando ácidos húmicos isolados e argilominerais como adsorventes. Logo, determinar os coeficientes de distribuição e em matéria orgânica (K_d e K_{oc}) em solo natural apesar de mais complexo, representa melhor a realidade.

A Tabela 24 apresenta os valores de K_d , K_{oc} e índice de GUS para a deltametrina em latossolo vermelho. As Tabelas 25 e 26 apresentam os mesmos resultados para AMPA e glifosato.

Tabela 25 – Potencial de lixiviação da deltametrina em latossolo vermelho de acordo com o índice de GUS.

Concentração mg L ⁻¹	Kd	Koc	GUS
0,1	4,79x10 ²	1,57x10 ⁴	-0,2900
0,25	6,65x10 ²	2,18x10 ⁴	-0,5000
0,5	1,23x10 ³	4,04x10 ⁴	-0,8956
0,75	2,71x10 ³	8,89x10 ⁴	-1,402
1,0	1,08x10 ³	3,54x10 ⁴	-0,8111
2,0	4,64x10 ³	1,52x10 ⁵	-1,747
4,0	1,69x10 ³	5,53x10 ⁴	-1,097
6,0	4,65x10 ³	1,52x10 ⁵	-1,747
8,0	2,44x10 ³	8,00x10 ⁴	-1,335
10,0	1,38x10 ⁴	4,53x10 ⁵	-2,446
15,0	3,59x10 ⁴	1,18x10 ⁶	-3,059
20,0	3,93x10 ³	1,29x10 ⁵	-1,640
25,0	6,01x10 ³	1,97x10 ⁵	-1,912
50,0	6,00x10 ⁴	1,96x10 ⁶	-3,388

Fonte: autoria própria

Tabela 26 – Potencial de lixiviação do AMPA em latossolo vermelho de acordo com o índice de GUS

Concentração mg L ⁻¹	Kd	Koc	GUS
0,1	1,34x10 ⁴	4,40x10 ⁶	-2,429
0,25	3,61x10 ⁴	1,18x10 ⁶	-3,062
0,5	7,28x10 ³	2,39x10 ⁵	-2,036
0,75	6,72x10 ³	2,20x10 ⁵	-1,984
1,0	2,00x10 ³	6,56x10 ⁵	-1,207
2,0	1,72x10 ³	5,64x10 ⁵	-1,110
4,0	7,23x10 ³	2,37x10 ⁵	-2,031
6,0	1,29x10 ³	4,22x10 ⁴	-0,923
8,0	7,32x10 ³	2,40x10 ⁵	-2,039
10,0	1,05x10 ⁴	3,44x10 ⁵	-2,270
15,0	4,30x10 ³	1,41x10 ⁵	-1,697
20,0	7,16x10 ³	2,36 x10 ⁵	-2,024
25,0	3,46x10 ³	1,13x10 ⁵	-1,558
50,0	5,49x10 ³	1,80x10 ⁵	-1,854

Fonte: autoria própria

Tabela 27 – Potencial de lixiviação do glifosato em latossolo vermelho de acordo com o índice de GUS

Concentração mg L ⁻¹	Kd	Koc	GUS
0,1	2,67x10 ³	8,77x10 ⁴	-1,393
0,25	3,29x10 ³	1,08x10 ⁵	-1,526
0,5	2,90x10 ⁴	9,50x10 ⁵	-2,921
0,75	1,56x10 ⁴	5,11x10 ⁵	-2,524
1,0	6,12x10 ⁴	2,01x10 ⁶	-3,401
2,0	1,83x10 ⁴	6,01x10 ⁵	-2,628
4,0	5,28x10 ⁴	1,73x10 ⁶	-3,307
6,0	3,73x10 ⁴	1,22x10 ⁶	-3,083
8,0	7,92x10 ⁴	2,60x10 ⁶	-3,567
10,0	8,00x10 ⁴	2,62x10 ⁶	-3,573
15,0	7,98x10 ⁴	2,62x10 ⁶	-3,571
20,0	9,71x10 ⁴	3,18x10 ⁶	-3,697
25,0	1,06x10 ⁵	3,47x10 ⁶	-3,753
50,0	1,71x10 ⁵	5,59x10 ⁶	-4,059

Fonte: autoria própria

O solo estudado apresenta 3,05% de carbono orgânico, conforme será apresentado no item 4.4.1.1 do Capítulo IV, sendo assim, é possível observar para todas as concentrações avaliadas que o índice de GUS é inferior a 1,8, logo, pela escala prevista no item 3.3.6, a deltametrina, o glifosato e o AMPA não lixiviam no solo estudado, logo, a probabilidade de existir uma contaminação de um corpo d'água por lixiviação é baixa.

O estudo de Jabeen e colaboradores (2015), avaliando deltametrina em corpos d'água, confirmam esse resultado. Resíduos do piretróide foram encontrados em sedimento e peixes, mas não em água superficial. A deltametrina apresenta baixo potencial tóxico para seres humanos, porém é extremamente tóxica para peixes e invertebrados aquáticos, devido ao seu metabolismo mais lento. Os piretróides apresentam a seguinte ordem de toxicidade: peixes > anfíbios > mamíferos > aves. É interessante notar que, apesar do baixo risco de toxicidade direta, a contaminação dos sistemas aquáticos pode trazer consequências desastrosas para toda a cadeia trófica, incluindo os seres humanos. [96], [97]

No que diz respeito ao glifosato (e consequentemente ao AMPA), a literatura apresenta vários exemplos de resíduos de glifosato encontrados em águas superficiais e de abastecimento, evidenciando que apesar da lixiviação

ser baixa, o herbicida pode ser encontrado em águas devido ao escoamento superficial. Albers e colaboradores afirmam que a lixiviação pode ocorrer em condições específicas. A mobilidade do glifosato no solo pode ser controlada através da formação de complexos entre glifosato e substâncias húmicas solúveis em água. [98]

Pelos experimentos realizados, foi possível observar que o glifosato apresenta alta adsorção no solo e baixo risco de lixiviação; porém, no Brasil, Delmonico e colaboradores (2014) encontraram $2,1 - 2,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA e $2,3 - 3,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato em águas de abastecimento público na cidade de Maringá-PR. Freire e colaboradores (2012) monitoraram o rio Maringá e lá também encontraram resíduos de glifosato. [99], [100] Esses resultados também mostram o escoamento superficial do herbicida.

Na Argentina, o trabalho de Aparício e colaboradores (2013) encontrou resíduos de glifosato e AMPA em água superficial em 15 e 12% das amostras, respectivamente, de 44 córregos amostrados no país. [101]

Simonsen e colaboradores (2008), entre 1993 e 2003, encontraram resíduos de glifosato e AMPA em 2,6% das amostras de poços de água subterrânea na Dinamarca, mesmo 2 anos após a última pulverização. Uma possível explicação é a presença do ânion fosfato, que tem uma influência sobre a quantidade de glifosato/AMPA lixiviado a partir do solo. O glifosato se liga ao solo através da porção ácido fosfônico e, por conseguinte, compete com fosfato por sítios de ligação. A adição de fosfato ao solo diminuiu a adsorção de glifosato que tinha sido adicionado previamente ao solo, o que pode ter provocado sua lixiviação. [102]

O coeficiente de distribuição K_d (L kg^{-1}) é uma importante ferramenta na estimativa do potencial de sorção do contaminante dissolvido em contato com o solo. K_d é definido como a razão entre a concentração de uma espécie na fase sólida e a que está em equilíbrio na solução, depois de um tempo determinado tempo de reação. É um parâmetro útil para comparar as capacidades absorventes de diferentes solos ou materiais, quando medidos de acordo com as mesmas condições experimentais. Quanto maior o K_d , maior a tendência do contaminante ficar adsorvido no solo. [77]

Já o K_{oc} é o coeficiente de distribuição do contaminante entre solo-água corrigido pelo conteúdo matéria orgânica do solo. A força de sorção entre a

deltametrina, glifosato, AMPA e o solo é medida pelo coeficiente de distribuição K_{oc} , que depende das propriedades físico-químicas destes contaminantes e da porcentagem de carbono orgânico do solo. Os Os valores de K_{oc} são normalmente determinados com base nos valores de K_d e corrigidos pela fração orgânica do solo. O K_d médio foi determinado através da Equação 10:

$$K_d = \frac{\Delta(x/m)}{\Delta C_e} \quad (10)$$

Para efeito de avaliação dos dados obtidos, os valores de K_d experimentais foram comparados com os valores de K_d calculados a partir de valores de K_{oc} da Comissão Europeia, na divisão de Saúde e Defesa do Consumidor, que em 2002 apresentou valores de K_{oc} para deltametrina e glifosato. Na Tabela 28 os valores de K_d calculados e experimentais são apresentados.

Tabela 28 – Comparação dos valores de coeficiente de distribuição (K_d) de deltametrina, glifosato e AMPA com base nos dados de K_{oc} segundo European Comiision (2002) com os dados obtidos experimentalmente das amostras de solo.

	Koc min – max (L kg⁻¹)	Kd calculado min – max (solo) (L kg⁻¹)	Kd experimental (solo) (L kg⁻¹)
Deltametrina	4,60 x 10 ⁵ – 1,63 x 10 ⁷	1,40 x 10 ⁴ – 4,97 x 10 ⁵	9,94 x 10 ³
AMPA	1,16 x 10 ³ – 2,48 x 10 ⁵	35,4 – 7,56 x 10 ³	8,14 x 10 ³
Glifosato	8,84 x 10 ² – 6,00 x 10 ⁵	26,9 – 1,83 x 10 ⁴	5,95 x 10 ⁴

Com base na Tabela 28, pode-se observar que os valores calculados de K_d para glifosato, AMPA e deltametrina estão na mesma ordem de grandeza que os obtidos pela Comissão Européia.

3.5 Conclusões

Deltametrina, glifosato e AMPA tem forte interação com a matéria orgânica presente no solo visto o maior valor de K_f para latossolo vermelho em comparação ao mesmo solo calcinado para todas as curvas de adsorção. Esse resultado se refere à solos cujo teor de argilas é baixo.

Para a dessorção, os valores de K_f em latossolo vermelho dos três xenobióticos avaliados é muito maior que o K_f obtido em solo calcinado, logo quando estes são adsorvidos na superfície de solos que contem matéria orgânica, dificilmente serão lixiviados para corpos d'água ou para camadas inferiores do solo. Essa evidência fica reforçada pelos resultados do índice de GUS, todos com valores menores que 1,8.

Os resultados obtidos neste capítulo podem esclarecer questões a respeito da retenção destes xenobióticos no solo, contribuindo para remediação eficaz ou até mesmo a prevenção da contaminação de corpos d'água. É importante destacar o grande papel da matéria orgânica.

Vale ressaltar que estes mesmos resultados são válidos apenas para o solo estudado. É sabido que, no Brasil, devido a sua vasta extensão territorial e conseqüentemente, diversos tipos de clima, existem diferentes tipos de solo, logo, para que se tenha condições de generalizar esse comportamento, é preciso que o mesmo experimento seja executado em solos de diferente composição.

No entanto, é fato que a MOS tem papel fundamental na adsorção de xenobióticos no solo.

Capítulo IV

Toxicidade de deltametrina e glifosato em minhocas *Eisenia foetida* e remediação de solos contaminados usando vermicompostagem

4.1 Introdução

4.1.1 Toxicidade

Segundo Oga e colaboradores (2008), toxicidade é a capacidade inerente a uma substância de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo, ou seja, é a medida relativa do potencial tóxico da substância sob condições controladas de exposição. Uma substância muito tóxica causará danos a um organismo se for administrada em quantidades muito pequenas, enquanto uma substância de baixa toxicidade somente produzirá efeito quando a quantidade administrada for muito grande. O conhecimento da toxicidade das substâncias químicas se obtém pela execução de experimentos em laboratório utilizando animais. [103]

A toxicidade de uma substância pode ser classificada segundo o seu tempo de resposta ou sua severidade. [104] No primeiro caso, a toxicidade pode ser:

1 – Aguda: efeitos tóxicos em animais são produzidos por uma única ou por múltiplas exposições a uma substância, por qualquer via, por um curto período (inferior a um dia). Na maioria das vezes, as manifestações ocorrem rapidamente;

2 – Subcrônica: efeitos tóxicos em animais produzidos por exposições diárias repetidas a uma substância, por qualquer via, aparecem em um período de aproximadamente 10% do tempo de vida de exposição do animal ou alguns meses;

3 – Crônica: efeitos tóxicos ocorrem após repetidas exposições, por um período longo de tempo, geralmente durante toda a vida do animal ou aproximadamente 80% do tempo de vida.

No segundo caso, a toxicidade é subdividida em:

- 1 – Leve: distúrbios produzidos no corpo humano podem ser rapidamente reversíveis e desaparecem com o término da exposição ou sem intervenção médica;
- 2 – Moderada: distúrbios produzidos no organismo são reversíveis e não são suficientes para provocar danos físicos sérios ou prejuízos à saúde;
- 3 – Severa: mudanças irreversíveis no organismo humano, suficientemente severo para produzirem lesões graves ou a morte.

4.1.2 Testes de toxicidade

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais. Nesses ensaios, organismos-teste são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados. [105]

Esses testes não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada substância apresenta para a população humana, uma vez que é difícil extrapolar para os seres humanos os resultados de toxicidade obtidos para os organismos em laboratório e até mesmo correlacionar os resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies. [105] No entanto, o uso de outros seres vivos (peixes, minhocas, ratos etc.) nos testes de toxicidade ajudam na extrapolação de potenciais riscos agudos e crônicos para seres humanos.

Muitos testes podem ser usados para avaliar a toxicidade e efeitos dos poluentes nos seres vivos. Em minhocas, os testes mais comuns são aqueles que envolvem exposição em papel de filtro umedecido ou fazem uso de solo artificial. O método do papel de filtro é rápido e confiável, e pode ser usado como teste prévio para avaliar a toxicidade dos produtos químicos agrícolas, enquanto que o teste envolvendo solo artificial conduz a dados de toxicidade

mais representativos de exposição natural das minhocas aos produtos químicos. [30]

Os testes de toxicidade fornecem medidas diretas da biodisponibilidade dos poluentes ou agentes tóxicos e podem ajudar a estabelecer ligações entre a contaminação local e os efeitos ecológicos adversos. Avaliam exposições agudas e crônicas e medem os efeitos biológicos resultantes dessas exposições, tais como, mortalidade, desempenho reprodutivo, crescimento e mudanças comportamentais. [106]

O teste de toxicidade aguda é classificado como um experimento de curta duração, que proporciona resposta rápida em estudos sobre efeitos tóxicos letais, cujo objetivo é determinar a concentração letal (CL) de uma substância. [107]

4.1.3 O uso de minhocas em testes de toxicidade

Os organismos do solo estão expostos a uma grande variedade de poluentes ambientais e as minhocas são um dos grupos mais importantes de organismos do solo devido ao seu papel importante na promoção da fertilidade do mesmo, logo, funcionam como bioindicadores para a avaliação ecotoxicológica da poluição do solo. [30]

O uso de bioindicadores é de grande importância uma vez que estes são capazes de revelar alterações causadas por poluentes no estado fisiológico dos organismos, proporcionando, assim, sinais de alerta precoces de risco ambiental de poluição ou estresse aos organismos. Além disso, essas respostas podem ser indicadores sensíveis de estresse químico antes que efeitos subletais, tais como inibição do crescimento ou reprodução, tornem-se aparentes. [30]

As minhocas são utilizadas para avaliação da contaminação do solo, pois tem seu desenvolvimento afetado por diversos compostos orgânicos e inorgânicos. [108] Elas usam os receptores sensíveis sobre a superfície de seu corpo para detectar produtos químicos no solo. [109] Geralmente são escolhidas por ingerirem grande quantidade de solo (capacidade de acumulação de poluentes), representam cerca de 92% da biomassa de

invertebrados presentes no solo e são importantes na reciclagem de nutrientes. [110]

As mais utilizadas nos ensaios de toxicidade são da espécie *Eisenia foetida*, pertencente do filo *Annelida*. Esta espécie é conhecida pela sua alta prolificidade e pela sua capacidade de se adaptar aos mais diferentes resíduos, para a geração de vermicomposto. [111] Sua respiração é feita por ramificações capilares (respiração cutânea) e são consideradas como organismos ácido-tolerantes, por possuírem glândulas calcíferas que permitem o controle da acidez dos resíduos. Quando o ambiente e a temperatura são favoráveis, a reprodução das minhocas pode originar 500 descendentes por indivíduo, por ano. O período de incubação de uma minhoca pode variar entre dez e vinte e um dias, se as condições do meio forem favoráveis. Caso contrário, os casulos não eclodem. [112]

Assim, os testes da OECD (Organização Europeia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico), da EPA (Agência Americana de Proteção do Ambiente) e da ISO (Organização Internacional para Padronização) entre outros, adotaram a espécie *Eisenia foetida* para os testes de toxicidade em solo, respectivamente em 1984, 1991 e 1993. [106]

4.1.4 O vermicomposto e a biorremediação de solos

A biorremediação é um processo em que organismos vivos (geralmente plantas, microrganismos e minhocas) são utilizados para remover ou reduzir (remediar) poluentes no ambiente, principalmente compostos orgânicos e só pode ser utilizada em locais onde o contaminante está presente. [113], [114]

A recuperação de áreas contaminadas deve ser prioridade tanto para as empresas potencialmente poluidoras como para os órgãos de controle ambiental. [115]

Por isso a biorremediação tem sido um processo de crescente pesquisa, pois tem como vantagem oferecer maior segurança e uma menor perturbação ao meio ambiente, além de ser uma ferramenta eficiente a baixo custo. [116]

Uma forma de biorremediação que vem sendo muito difundida é o uso de vermicomposto, que é o produto final da vermicompostagem.

Vermicompostagem é o processo de estabilização da matéria orgânica, resultante da ação combinada de minhocas e da microflora que vive em seu trato digestivo. [110], [117]

Na literatura existem trabalhos sobre solos contaminados por metais sendo recuperados com o uso de vermicomposto, o que mostra o crescimento da técnica nos últimos anos. [118] O trabalho de Mendes e colaboradores (2014) mostra a eficiência na retenção de elementos metálicos como cromo, cobre e chumbo em vermicomposto, melhorando assim a qualidade do solo. [119]

Pereira e colaboradores (2014), em artigo de revisão, discorrem que quando o vermicomposto é adicionado a solos contaminados, um grande número de variáveis devem ser consideradas, tais como o tamanho das partículas do solo, as características estruturais das argilas presentes no solo, e a quantidade e qualidade da fração húmica do vermicomposto, bem como as características físicas e químicas dos poluentes. Geralmente, xenobióticos polares tem maior afinidade com os grupos hidrofílicos do vermicomposto e tendem a ter melhores resultados no processo de remediação de solos. Outro fator importante é a capacidade dos microrganismos em alterarem a estrutura química dos poluentes, pois o vermicomposto não pode ser considerado apenas como uma fonte de microrganismos para solos, mas também como uma fonte de nutrientes para a microbiota nativa desses ecossistemas. [120]

Em todo o mundo, a preocupação com a contaminação do solo tem crescido nas últimas décadas. Na Europa, esta tem sido identificada pelo Thematic Strategy for Soil Protection como uma das principais ameaças à sustentabilidade desse recurso. [121] Em 2009 foi aprovada no Brasil a Resolução CONAMA 420, que estabelece as diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas. [122]

4.1.5 Estatística

A estatística é um ramo da ciência que dá informações para o analista desde o procedimento de coleta das amostras até o tratamento de seus resultados. Ela consegue extrair informações de dados para melhor

compreensão das situações que elas representam e utiliza teorias de probabilidade para explicar a ocorrência de diversos eventos. [123]

Os fundamentos matemáticos da estatística foram propostos no século XVII com o desenvolvimento da teoria das probabilidades por Pascal e Fermat, que surgiu com o estudo dos jogos de azar. O uso de computadores tem permitido a avaliação de dados estatísticos antes impraticáveis. [124]

3.1.5.1 Teste ANOVA

O teste ANOVA (analise of variance) é aplicado quando se tem um conjunto de dados e é preciso desvendar se todos eles são significativamente diferentes entre si. É um teste estatístico muito difundido entre os analistas. O teste foi desenvolvido por R.A. Fischer como instrumento para análise de experimentos agrícolas. [125]

A principal aplicação da ANOVA é a comparação de médias oriundas de grupos diferentes, também chamados tratamentos, como, por exemplo, médias históricas de questões de satisfação, aplicação de diferentes dosagens de determinado pesticida/fertilizante no solo, entre muitas outras.

Para realizar o teste ANOVA, é necessário que se tenha duas hipóteses: a hipótese nula e uma hipótese alternativa. Neste teste, a principal informação obtida é o valor de P. Se este valor for menor que 0,05 (95% de confiança), a hipótese nula é mantida, ou seja, a hipótese de que todos os dados são diferentes entre si é válida, logo, existe diferença entre os tratamentos. Caso o valor de P seja superior a 0,05, essa mesma hipótese nula deve ser rejeitada, isto é, os dados são numericamente iguais entre si. [126]

3.1.5.2 Teste de Dunnett

O teste de Dunnett, lançado em 1955, é um teste de comparações múltiplas em que as médias de possíveis tratamentos testados são comparadas a um tratamento controle. É um teste interessante para ser feito

quando se desenvolve um novo fármaco, para se avaliar o grau de contaminação de um xenobiótico no organismo etc. Segundo McHugh (2011), o teste é eficaz na descoberta de pequenas, mas significativas diferenças entre os grupos avaliados. [127]–[129]

Logo, o teste serve exclusivamente para comparar o efeito dos tratamentos com o efeito do controle. A significância deste teste implicará apenas na conclusão de que os grupos tratados apresentam diferença com o grupo controle. [127], [128]

A limitação do teste de Dunnett se refere à dificuldade de se obter probabilidades estatísticas diferentes de 95%, já que não há valores tabelados diferentes de 0,5. [128]

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo Geral

A adição xenobióticos ao solo em larga escala provoca efeito tóxico para os seres vivos que nele habitam e é de suma importância estudar em que escala ela ocorre, bem como o modo em que estes xenobióticos afetam o comportamento destes.

4.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o potencial tóxico do glifosato e da deltametrina em minhocas *Eisenia foetida* por meio de testes de mortalidade, biomassa e reprodução;

Verificar diferenças de comportamento das minhocas na presença de glifosato/deltametrina;

Avaliar o grau de remediação de vermicomposto de bagaço de laranja e de torta de filtro em amostras de solo contaminadas por glifosato e deltametrina.

4.3 Experimental

4.3.1 Materiais

4.3.1.1 Vidrarias

Balão volumétrico (10 e 250 mL);
Erlenmeyer (500 mL);
Funil de Buchner;
Kitasato (500 mL);
Peneira (2,5 mm);
Proveta (25, 100 e 1000 mL);
Recipiente de plástico resistente (15x15x10).

4.3.1.2 Reagentes

Água deionizada;
Carvão ativo;
Deltamax® 25 SC (Insetimax Indústria Química LTDA);
Fenolftaleína 0,01%;
Glifosato® AKB 400 (Kelldrin Indústria e Comércio de Produtos Químicos e Agrícolas LTDA);
 H_2O_2 PA;
 H_2SO_4 PA;
Solução de CaAc_2 0,5 mol L⁻¹;
Solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹;
Solução de HCl 0,5 mol L⁻¹;
Solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

4.3.1.3 Equipamentos

Almofariz e pistilo;

Analisador de carbono Shimadzu (TOC-VCPH, acoplado ao módulo para amostras sólidas SSM-5000A);

Balança analítica (BG 1000 Gehaka);

Espectrofotômetro HACH (DR 6000);

Estufa (Ethik Technology 402/D);

Mesa agitadora (Tecnal TE-140);

Micro-ondas (Berghof Speed Wave Four);

Mufla (EGG 1800);

pHmetro (pHMeter Tec 2 – Tecnal);

4.3.1.4 Outros

Minhocas *Eisenia foetida* (SOBLOCO, Fazenda Santa Cândida, São Carlos);

Papel de filtro.

4.3.2 Coleta e caracterização inicial do solo usado para testes toxicológicos

O solo natural utilizado para a condução dos experimentos de toxicidade foi coletado na propriedade rural mencionada no Capítulo III, no item 3.3.2, segundo parágrafo, e foi escolhido com base no conhecimento prévio do local com a intenção de garantir a não presença de pesticidas no solo.

Amostras do solo foram secas em estufa à temperatura de aproximadamente 50 °C até atingirem massa constante, maceradas em almofariz e pistilo e peneiradas em peneira de 2,0 mm de abertura de malha. Os resíduos foram caracterizados quanto à análise granulométrica [86], [87], (item 3.4.1, Capítulo III) pH em solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ [58], matéria orgânica [59], umidade e carbono orgânico total. As amostras envolvidas na avaliação do potencial remediador de vermicomposto também foram

caracterizadas quanto ao teor de nitrogênio Kjeldahl [130], fósforo total e capacidade de troca catiônica. [131], [132]

4.3.2.1 pH (potencial hidrogeniônico)

A descrição da metodologia está descrita no Capítulo II, item 2.3.5.1.

4.3.2.2 Matéria orgânica

A descrição da metodologia está descrita no Capítulo II, item 2.3.5.2.

4.3.2.3 Umidade

Colocaram-se cerca de 10 g da amostra de solo na estufa a 100-110°C por 24 horas. Para o cálculo da umidade, foi utilizada a Equação 11 das amostras. [58] O experimento foi realizado em quintuplicata.

$$\%W_{(100 - 110\text{ }^{\circ}\text{C})} = \frac{M - M_s}{M} \times 100 \quad (11)$$

Onde: %W: porcentagem de umidade da amostra.

M: massa da amostra inicial.

Ms: massa da amostra após a secagem.

4.3.2.4 Capacidade de troca catiônica

A determinação da capacidade de troca catiônica (CTC) foi baseada na metodologia de Rodella e Alcarde [132] que fizeram uma adaptação da metodologia da Association of Official Analytical Chemists, empregada para análise de CTC de turfa. Esta metodologia também foi seguida por Fialho. [131]

Foram pesados cerca de 2,000 g de amostra de solo seco e 1,000 g de carvão ativado e transferidos juntamente com 100 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ para

um balão de 250 mL. Esta mistura foi agitada por 30 minutos em agitador orbital (Tecnal TE-140). Montou-se o sistema de filtração a vácuo, colocando-se sobre o funil de Buchner um disco de papel de faixa azul. Como o papel foi umedecido, aplicou-se sucção moderada e transferiu-se a mistura lavando o balão com porções de água destilada. Procederam-se sucessivas lavagens do material orgânico retido no funil, desagregando-o com jatos provenientes de uma pisseta e enchendo o funil até 1 cm de sua borda. A próxima lavagem era realizada após todo líquido da lavagem anterior ter sido drenado.

Fez-se um número de lavagens suficientes para obter um volume de 350 mL no Kitasato de 500 mL. Após a fase das lavagens, trocou-se o Kitasato por outro de igual capacidade e foram transferidas 10 alíquotas de 10 mL de solução de CaAc_2 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0, sendo distribuídas sobre toda superfície do material orgânico sob vácuo reduzido, para permitir uma lenta percolação. Uma nova porção de solução de acetato de cálcio foi adicionada, após a porção anterior ter sido drenada para o Kitasato.

Após a adição dos 100 mL de acetato de cálcio, o material orgânico foi lavado com porções de água destilada até totalizar um volume de, aproximadamente, 300 mL no Kitasato. Esta solução foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL e titulada com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, previamente padronizada. Utilizou-se fenolftaleína como indicador.

Foi conduzida uma análise, empregando-se o carvão ativado e omitindo a presença da amostra.

A Equação 12 foi usada para o cálculo da CTC:

$$\text{CTC (mmol}_c\text{ kg}^{-1}) = [(V_a - V_b) \times (C \div m)] \quad (12)$$

Sendo V_a e V_b os volumes de solução de NaOH gastos nas titulações das amostras e da titulação da amostra branco, respectivamente (em mL), C é a concentração da solução padronizada de NaOH (em mol L^{-1}), e m é a massa de solo utilizada (em kg).

4.3.2.5 Carbono

A metodologia está descrita no Capítulo II, item 2.3.5.3.

4.3.3 Ensaaios de Toxicidade

Os ensaios de toxicidade seguiram a *Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA*, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2013. A metodologia foi realizada de acordo com as ISO 11268-1, 11268-2 e ASTM E-1676. [133]–[136]

4.3.3.1 Organismos teste

A escolha do organismo de teste, as condições para a sua manutenção em laboratório, e os requisitos para a sua utilização nos ensaios foram baseadas no protocolo ISO. [133], [134]

As minhocas *Eisenia foetida* são tidas como bioindicadores ambientais e são internacionalmente aceitas, já que as minhocas são organismos muito importantes no ecossistema solo além de sua sensibilidade e relativa facilidade de criação.

Os lotes de minhoca *Eisenia foetida* foram obtidos de produtores na cidade de São Carlos, SP, Brasil e foram conservados e mantidos no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (LQA / IQSC / USP), São Carlos, SP, Brasil, em uma mistura de latossolo vermelho seco e esterco bovino seco (50:50 v/v) em recipientes de plástico resistente (15 cm x 15 cm x 10 cm, com fundo arredondado e tampa perfurada) com uma capacidade de 1.000 g de substrato seco, a uma temperatura constante de 20 °C com foto período de 16 h/8 h de luz/escuro. Esta mistura foi umedecida periodicamente para manter o teor de umidade entre 40 e 60%. Os indivíduos utilizados nos testes foram os adultos (com presença de clitelo), com peso médio de 200 mg. A cada duas semanas, após a pesagem das minhocas, as mesmas foram alimentadas com uma colher de sopa rasa de flocos de aveia, previamente cozidas em água destilada.

4.3.3.2 Formulações comerciais

Glifosato® AKB 400 (Kelldrin Indústria e Comércio de Produtos Químicos e Agrícolas LTDA) é uma formulação comercial de glifosato que contém 48 g L⁻¹ de princípio ativo.

Deltamax® 25 SC (Insetimax Indústria Química LTDA) é uma formulação comercial de deltametrina que contém 25 g L⁻¹ de princípio ativo.

4.3.3.3 Purga de minhocas em papel de filtro umedecido

As minhocas usadas nos testes de toxicidade foram lavadas em água destilada e mantidas por 24 h em recipiente fechado (com abertura na tampa) contendo papel de filtro umedecido, a fim de se fazer a limpeza de seu conteúdo intestinal.

4.3.3.4 Preparo dos vermicompostos

Resíduos constituídos a partir de casca de laranja e torta de filtro foram compostados separadamente em pilhas de 2,25 m³ (2,5 m de comprimento x 2,5 m de largura x 1 m de altura) durante 40 dias, até o processo de compostagem retornar à fase mesofílica (observado por medições de temperatura diárias). Após esse período, a casca de laranja foi misturada ao esterco bovino (2:1) em três réplicas, adicionaram-se cerca de 500 minhocas a cada réplica e o material foi vermicompostado por 135 dias. A torta de filtro foi submetida ao mesmo tratamento, porém com a razão de (3:1). A proporção de resíduos foi calculada para se obter uma razão inicial de C/N entre 20 e 30 para as pilhas. Serragem foi usada como agente estruturante e para ajudar na aeração destas pilhas. [137]

4.3.3.5 Montagem dos experimentos

4.3.3.5.a Glifosato

O experimento seguiu o delineamento de 1x7x5, ou seja, um tipo de tratamento (envolvendo a formulação de glifosato), em sete concentrações distintas e cinco réplicas. Foram preparadas também cinco amostras controle, o que totalizou 40 potes.

As soluções da formulação comercial utilizadas para a montagem dos testes foram nas seguintes concentrações: 96 (recomendada pelo fabricante), 3.000, 4.500, 6.000, 7.500 e 10.000 mg kg⁻¹ a fim de simular contaminações por derramamento do herbicida.

Aproximadamente 500 g de latossolo vermelho seco foram colocados em recipientes de plástico resistente (15 cm x 15 cm x 10 cm, com fundo arredondado e tampa perfurada) e umedecidos até aproximadamente 60% de teor de umidade.

A seguir, para cada concentração, foram adicionados 10 mL de solução da formulação comercial de glifosato em cinco recipientes distintos. Foram preparados também cinco recipientes com 10.000 mg kg⁻¹ com a adição de 15 g (3%) de vermicomposto de torta de filtro. Em seguida, colocaram-se 10 minhocas adultas e tamparam-se os recipientes.

4.3.3.5.b Deltametrina

O experimento seguiu o delineamento de 2x6x5, ou seja, dois tipos de tratamento (um envolvendo a formulação comercial de deltametrina e outro envolvendo a formulação comercial contendo apenas os dispersantes, fornecida pelo fabricante), em seis concentrações distintas e cinco réplicas. Foram preparadas também cinco amostras controle, o que totalizou 65 potes.

As soluções da formulação comercial utilizadas para a montagem dos testes tiveram as seguintes concentrações: 5 (recomendada pelo fabricante), 100, 250 e 500 mg kg⁻¹ a fim de simular contaminações por derramamento do piretróide.

Aproximadamente 500 g de latossolo vermelho seco foram colocados em recipientes de plástico resistente (15 cm x 15 cm x 10 cm, com fundo arredondado e tampa perfurada) e umedecidos até aproximadamente 60% de teor de umidade.

A seguir, para cada concentração, foram adicionados 10 mL de solução da formulação comercial de deltametrina em cinco recipientes distintos. Foram preparados também cinco recipientes com 500 mg kg⁻¹ com a adição de 15 g (3%) de vermicomposto de torta de filtro e outros cinco recipientes com 500 mg kg⁻¹ com a adição de 15 g (3%) de vermicomposto de bagaço de laranja. Em seguida, colocaram-se 10 minhocas adultas e tamparam-se os recipientes.

4.3.3.6 Ensaios de Toxicidade Aguda (Mortalidade) e Ganho de Biomassa

Nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, as minhocas foram retiradas dos potes, lavadas em água corrente, secas e pesadas. Para a toxicidade aguda, foram avaliadas as mortes das minhocas ocorridas nas duas primeiras semanas, ou seja, até o 14^o dia.

A mortalidade foi determinada por contagem do número de minhocas mortas. As minhocas foram consideradas mortas quando não apresentavam movimento nem respondiam a nenhum estímulo tátil. Como as minhocas tendem a se desintegrar rapidamente, em caso de falta de alguma minhoca, elas foram consideradas mortas. Os valores de DL₂₀ foram calculados usando o programa de modelagem PriProbit® usando os dados de mortalidade.

Para o estudo do ganho de biomassa, foram calculadas e analisadas as porcentagens de ganho/perda de biomassa total e entre cada semana até o 28^o dia. Semanalmente, monitorou-se a umidade em cada pote.

4.3.3.7 Ensaios de Reprodução

O ensaio de reprodução foi feito posteriormente ao ensaio de ganho de biomassa. Após o 28^o dia, as minhocas sobreviventes foram retiradas dos potes e o monitoramento de umidade (60%) continuou até o 56^o dia. Neste dia, realizou-se a contagem de casulos, ovos e/ou minhocas jovens.

4.3.3.8 CL₂₀

Os valores de concentração letal (CL₂₀) foram calculados pelo programa Priprobit®, um software produzido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, disponível para download em <<http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=11284>>.

Os dados foram organizados em arquivos txt em três colunas (concentração, sobreviventes e mortos), em que os valores usados foram a soma dos sobreviventes/mortos nas cinco réplicas. Em seguida, a tabela foi salva e realizou-se o cálculo de DL₂₀ de acordo com as instruções do software.

4.3.4 Análises Estatísticas

Para os testes de toxicidade, todos os cálculos foram realizados considerando as cinco réplicas realizadas para cada concentração e considerando um nível de significância de 95%.

4.3.4.1 ANOVA

Os dados obtidos foram organizados em planilha do Microsoft Excel 2010®, em seis colunas (concentração, e tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias) e todos os valores (das cinco réplicas, sem cálculo de média) foram distribuídos nessa tabela.

A seguir, os cálculos do teste ANOVA foram realizados através da ferramenta Análise de Dados no Microsoft Excel 2010®, selecionando-se a opção “Anova: fator único”.

4.3.4.2 Teste de Dunnett

Os dados obtidos foram organizados em planilha do Microsoft Excel 2010®, em seis colunas (concentração, e tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias) e

todos os valores (das cinco réplicas, sem cálculo de média) foram distribuídos nessa tabela.

A seguir, os cálculos do teste de Dunnett foram realizados via suplemento Action para Microsoft Excel 2010®, selecionando-se a opção “ANOVA: teste de comparações múltiplas: Dunnett”.

4.4 Resultados e Discussões

Todas as determinações envolvendo a caracterização do solo foram realizadas em quintuplicata, sendo o erro para um intervalo de confiança de 95 % calculado pela Equação 13:

$$e = \pm \frac{(t \times \sigma)}{\sqrt{n}} \quad (13)$$

onde:

e = erro;

t = coeficiente de Student tabelado;

σ = desvio-padrão;

n = tamanho da amostra (3).

4.4.1 Caracterização do solo

4.4.1.1 Análise granulométrica

Os resultados estão apresentados no item 3.4.1 do Capítulo III.

4.4.1.2 pH, umidade, matéria orgânica, carbono e acidez trocável

A Tabela 29 apresenta os resultados da caracterização do solo natural usado nos testes de toxicidade envolvendo as formulações comerciais de glifosato e deltametrina.

Tabela 29 – Parâmetros físico-químicos avaliados no solo natural utilizado nos testes de toxicidade envolvendo as formulações comerciais de glifosato e deltametrina.

pH	UMIDADE (%)	MATÉRIA ORGÂNICA (%)	CARBONO (%)	CTC (cmol _c dm ⁻³)
4,12 ± 0,37	24,19 ± 0,90	5,91 ± 0,18	3,05 ± 1,47	0,2199 ± 0,049

Fonte: autoria própria

Os resultados mostram que o solo é ácido. Embora as minhocas apresentem maior porcentagem de sobrevivência em valores baixos de pH, o valor obtido está abaixo da faixa ótima (5 a 6). Apesar disso, a acidez do solo não influenciou o experimento de forma significativa, pois de acordo com Primavesi (2002), devido ao fato das minhocas da espécie *Eisenia foetida* possuírem glândulas calcíferas, isso permite o controle da acidez do meio, através da liberação de secreções de carbonato de cálcio. [138]

No que se refere à umidade do solo, pode-se perceber que esta é baixa, logo, para a condução dos experimentos de toxicidade, é necessário que se acrescente água, a fim de manter a umidade em níveis aceitáveis (60%) para o desenvolvimento das minhocas, uma vez que elas respiram através da pele e que sua morte ocorre quando a pele seca [139], a alta umidade do solo é essencial para evitar o óbito das minhocas e, conseqüentemente, minimizar erros nos experimentos de toxicidade aguda dos xenobióticos estudados em análise.

A matéria orgânica presente no solo mostra que, de acordo com resultados obtidos por Cherubin e colaboradores (2015) e Silva e colaboradores (2015) [140], [141] o solo possui um teor dentro do esperado para solos brasileiros. É interessante destacar que a metodologia utilizada não foi a recomendada pelo Manual de Métodos de Análise Solos da Embrapa [58] devido ao alto teor de cromo hexavalente residual. A combustão a 550°C também apresenta falhas, tais como a remoção da água de composição dos solos (além da matéria orgânica), porém, optou-se por essa metodologia por ela ser menos danosa ao pesquisador e ao ambiente.

4.4.2 Ensaio de Toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados como ferramenta para o estudo da proposta de remediação de solos contaminados com glifosato e deltametrina utilizando vermicomposto e, para isso, adotaram-se duas estratégias de análise.

A primeira delas foi simular casos envolvendo derramamento, um caso típico de acidente ambiental, onde não se sabe ao certo a quantidade de

material que foi absorvido, mas que, com certeza, está além dos limites permitidos pelas leis nacionais/internacionais. O IBAMA, em seu relatório de acidentes ambientais mais recente (2013), afirma que no período de 2006 a 2013 foram registrados 3.970 eventos caracterizados como acidentes ambientais. E que em 2013 a região Sudeste apresentou maior percentual de registro de acidentes ambientais, com 61%, com São Paulo e Minas Gerais com as maiores ocorrências. [142] No país, há casos famosos de acidentes resultantes em contaminação de solos, tais como os acidentes da Rhodia, em Cubatão, no ano de 1965 e da Shell, em Paulínia em 2001, ambos no estado de São Paulo e a “Cidade dos Meninos”, em Duque de Caxias, Rio de Janeiro, em 1950. [143][143][23], [143], [144]

A outra estratégia foi a possibilidade de se usar um solo remediado para qualquer prática agrícola. Para isso, estipulou-se a aplicação de 3% de vermicomposto no solo contaminado, a fim de saber se essa quantidade seria suficiente para sua remediação e posterior utilização agrícola.

Em relação à interpretação dos resultados dos testes, é necessário que se responda às seguintes perguntas:

- 1) Houve efeito do tratamento proposto?
- 2) Se sim, quais doses são significativamente diferentes do experimento de referência?
- 3) Qual a maior dose/concentração que não provocou toxicidade na resposta dos organismos?
- 4) Qual a menor dose/concentração que provocou toxicidade na resposta dos organismos?
- 5) Qual dose/concentração que causou inibição? E de quanto foi essa inibição?

Para isso, os dados dos testes de toxicidade aguda (mortalidade), ganho de biomassa e reprodução foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguida de teste de Dunnett para comparação entre médias dos tratamentos com a média do tratamento controle.

Todos os cálculos foram realizados considerando as cinco réplicas realizadas para cada concentração e considerando um nível de significância de 95%.

4.4.2.1 Ensaios de toxicidade aguda (mortalidade)

Shi e colaboradores (2007) afirmam que a taxa de mortalidade pode ser usada como um indicador de poluição ambiental. A seguir, estão apresentados os resultados obtidos para os testes de mortalidade envolvendo glifosato e deltametrina. [145]

4.4.2.1.1 Glifosato

A Tabela 30 mostra o percentual médio da mortalidade durante a exposição de minhocas *Eisenia foetida* a um gradiente de concentração de formulação comercial de glifosato durante 14 dias.

Tabela 30 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. P valor referente ao Teste de Dunnett para n=5.

Tratamentos	x% de mortalidade	P valor
Solo referência	0 ± 0	-
96 mg kg⁻¹	0 ± 0	1
3.000 mg kg⁻¹	0 ± 0	1
4.500 mg kg⁻¹	0 ± 0	1
6.000 mg kg⁻¹	6 ± 7	1,73E-2
7.500 mg kg⁻¹	12 ± 6	1,49E-6
10.000 mg kg⁻¹	12 ± 6	4,66E-6
10.000 mg kg⁻¹ + VTF	0 ± 0	1

VTF = vermicomposto de torta de filtro

Fonte: autoria própria

Observando-se a Tabela 30, nota-se que a maior taxa de mortalidade obtida foi de 12% (a partir de 7500 mg kg⁻¹). O teste de Dunnett foi executado para se comprovar em quais doses a mortalidade é significativamente diferente da referência e, observando os valores de P, é possível verificar que a

diferença de percentual de mortalidade entre a amostra referência (sem aplicação de formulação comercial de glifosato) e as concentrações de 96, 3.000, 4.500 e 10.000 mg kg⁻¹ + VTF, a 95% de significância, não apresentam diferenças estatísticas entre si, pois $P > 0,05$, logo, a hipótese de diferença entre os grupos deve ser descartada. O mesmo já não ocorre nas concentrações de 6000, 7500 e 10000 mg kg⁻¹, em que $P < 0,05$, ou seja, a hipótese nula é mantida (há diferença significativa entre esses grupos).

Observa-se assim que, ao adicionar o vermicomposto de torta de filtro, o comportamento da amostra não difere significativamente do controle, mas difere do experimento de 10.000 mg kg⁻¹ sem a adição de matéria orgânica, logo, a adição de vermicomposto provoca uma melhora do desenvolvimento das minhocas, pois mascara o efeito tóxico do herbicida.

Com o resultado do teste, é possível apresentar graficamente os dados de mortalidade da Tabela 30 mostrando quais tratamentos são estatisticamente diferentes da referência (Figura 46).

Figura 46 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Para a determinação das doses letais (CL_{50} e CL_{20}) foram usados os dados obtidos nos testes de mortalidade e o programa PriProbit®.

De acordo com a normatização da ISO 11268-1 e 11268-2 [133], [134], a CL_{50} só pode ser estimada se houver uma mortalidade superior a 50% e, se a mortalidade no experimento referência for maior que 20%, o teste de mortalidade é invalidado, sendo necessária a sua repetição.

Nos experimentos envolvendo a formulação comercial de glifosato não houve em nenhum teste uma mortalidade superior a 50%, logo, a CL_{50} não foi calculada.

Foi possível apenas estimar a CL_{20} , que para as condições do experimento foi de $(1,35 \pm 4,13) \times 10^3 \text{ mg kg}^{-1}$.

4.4.2.1.2 Deltametrina

A Tabela 31 mostra o percentual médio da mortalidade durante a exposição de minhocas *Eisenia foetida* a um gradiente de concentração de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo durante 14 dias.

Tabela 31 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural. P valor referente ao Teste de Dunnett para n=5.

Tratamentos	x% de mortalidade		P valor	
	SEM DELTA	COM DELTA	SEM DELTA	COM DELTA
Solo referência	0 ± 0	0 ± 0	-	-
5 mg kg⁻¹	0 ± 0	12 ± 6	1	2,20E-03
100 mg kg⁻¹	0 ± 0	8 ± 6	1	0,0608
250 mg kg⁻¹	0 ± 0	4 ± 7	1	0,6024
500 mg kg⁻¹	6 ± 7	4 ± 7	0	0,6024
500 mg kg⁻¹ + VTF	0 ± 0	4 ± 7	1	0,6024
500 mg kg⁻¹ + VBL	0 ± 0	16 ± 7	1	5,62E-05

DELTA = deltametrina

VTF = vermicomposto de torta de filtro

VBL = vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Observando-se a Tabela 31, para os experimentos contendo apenas os dispersantes, nota-se que a maior taxa de mortalidade obtida foi de 6%, na concentração de 500 mg kg^{-1} e o valor de P encontrado no teste de Dunnett comprova isso. É possível notar também que, ao adicionar os vermicompostos de torta de filtro e bagaço de laranja, o comportamento dessas amostras não diferem significativamente da referência, mas difere do experimento de 500 mg kg^{-1} (sem a adição de matéria orgânica), logo, a adição de vermicomposto provoca alterações no que diz respeito à mortalidade das minhocas.

Os experimentos envolvendo a formulação completa por sua vez apresentaram resultados diferentes. Houve presença de minhocas mortas em todos os experimentos, mas apenas as concentrações de 5 mg kg^{-1} e a de $500 \text{ mg kg}^{-1} + \text{VBL}$, (a 95% de significância), apresentaram diferenças estatísticas do experimento referência.

A diferença de comportamento entre os vermicompostos pode estar relacionada ao grau de degradação dos resíduos. Durante seu preparo, após 135 dias, o resíduo de bagaço de laranja ficou totalmente degradado enquanto o resíduo de torta de filtro apresentou degradação menor. Logo, pode-se supor que a degradação parcial do resíduo de torta de filtro na vermicompostagem alterou o comportamento dos ensaios de mortalidade, já que serviu como alimento e deixou o pH do solo do experimento mais ácido.

Com o resultado deste teste, é possível apresentar o gráfico de mortalidade mostrando quais tratamentos são estatisticamente diferentes da referência, conforme a Figura 47.

Figura 47 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina (sem e com princípio ativo), em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Com este gráfico percebe-se que a presença da deltametrina na formulação provoca maior mortalidade do que os dispersantes presentes na mesma formulação.

Para a determinação das doses letais (CL₅₀ e CL₂₀) foram usados os dados obtidos nos testes de mortalidade e o programa PriProbit®.

Nos experimentos envolvendo a formulação comercial apenas com os dispersantes não houve em nenhum teste uma mortalidade superior a 50%, logo, a CL₅₀ não foi calculada. Porém, não houve mortalidade no experimento referência em número superior a 20%, logo, foi possível estimar a CL₂₀, que para as condições do experimento foi de $(1,18 \pm 7,07) \times 10^7 \text{ mg kg}^{-1}$.

Nos experimentos envolvendo a formulação comercial de deltametrina completa, também não houve em nenhum teste uma mortalidade superior a 50%, logo, a CL₅₀ não foi calculada. Também foi possível estimar a CL₂₀, que para as condições do experimento foi de $(1,29 \pm 0,89) \times 10^{-1} \text{ mg kg}^{-1}$.

4.4.2.2 Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO)

4.4.2.2.1 Glifosato

Para se determinar a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO) basta observar os valores de P obtidos no teste de Dunnett nos ensaios de mortalidade. A última concentração da série que apresentar $P > 0,05$, isto é, em que a hipótese nula seja rejeitada, é a concentração máxima na qual não há diferença significativa em relação à referência. Pode-se, então, afirmar que esta concentração seja a CENO. Já a primeira concentração da série que apresentar $P < 0,05$ ou seja, a hipótese nula é mantida e há diferença significativa em relação ao controle, é a CEO. A Tabela 30 apresenta esses valores na última coluna.

Sendo assim, para os experimentos envolvendo glifosato, a CENO é de 4.500 mg kg^{-1} , isto é, até essa concentração, nenhum efeito é significativamente observado. Já a CEO é de 6.000 mg kg^{-1} , ou seja, a partir dessa concentração, efeitos deletérios passam a ser notados nas minhocas.

É interessante ressaltar que entre a CENO e a CEO existe uma diferença de 1.500 mg kg^{-1} , então, para um estudo futuro, sugere-se o uso de menores intervalos entre as concentrações, a fim de se alcançar maior exatidão nos valores dessas concentrações limites. Correia e Moreira (2010) avaliaram em seu estudo que, em concentrações até 1000 mg kg^{-1} , as minhocas apresentaram gradual redução de peso e alterações morfológicas durante o experimento, mas que todas as minhocas foram classificados como vivas em todos os momentos de amostragem, [108] o que sugere que a CEO realmente é um valor bastante elevado para o glifosato.

4.4.2.2.2 Deltametrina

A Tabela 31 apresenta na última coluna, os valores de P calculados para a determinação da CENO e CEO.

Para os experimentos onde há apenas os dispersantes, a CENO foi de 250 mg kg^{-1} , e a CEO, 500 mg kg^{-1} . Quando se analisa a formulação completa, a CENO ficou abaixo de 5 mg kg^{-1} e a CEO, 5 mg kg^{-1} .

Para um estudo futuro, sugere-se o uso de menores intervalos entre as concentrações, a fim de ter maior exatidão nos valores dessas concentrações limite.

4.4.2.3 Ensaios de biomassa

Trabalhos de Santadino e colaboradores (2014) afirmam que a biomassa e o número de minhocas podem ser afetados pelo uso regular de herbicidas na agricultura, logo a seguir apresentam-se os resultados obtidos para este ensaio.[146]

4.4.2.3.1 Glifosato

A Tabela 32 apresenta os valores de variação de biomassa percentual na presença do herbicida glifosato.

Tabela 32 – Variação de biomassa percentual de cada réplica do teste de toxicidade envolvendo minhocas *Eisenia foetida* em formulação comercial de glifosato durante 28 dias, em solo natural.

Concentração (mg kg ⁻¹)	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
0	0,00	3,50	7,84	8,32	8,59
0	0,00	8,12	16,11	10,36	12,30
0	0,00	5,91	23,54	30,43	24,74
0	0,00	5,49	8,21	9,20	26,69
0	0,00	8,89	25,97	31,38	39,64
96	0,00	4,95	-0,81	-10,86	-18,93
96	0,00	4,36	-5,16	-9,83	-19,03
96	0,00	2,89	-5,32	-13,66	-23,29
96	0,00	5,45	0,63	-3,71	-10,52
96	0,00	4,21	1,37	-10,43	-27,07
3.000	0,00	8,37	0,30	-10,10	-21,72
3.000	0,00	9,76	-1,39	-13,29	-23,12
3.000	0,00	10,95	-5,26	-9,77	-25,29
3.000	0,00	9,72	-1,61	-13,05	-26,90
3.000	0,00	4,11	-3,03	-13,78	-23,93
4.500	0,00	7,11	0,81	-2,44	-14,39
4.500	0,00	1,93	-4,19	-7,29	-20,74
4.500	0,00	3,38	-3,93	-11,83	-26,72
4.500	0,00	4,94	-4,86	-11,99	-19,74
4.500	0,00	-0,23	-6,63	-8,63	-20,27
6.000	0,00	-17,97	-25,67	-42,70	-50,07
6.000	0,00	-11,82	-15,18	-21,38	-26,30
6.000	0,00	-13,10	-21,79	-31,03	-41,73
6.000	0,00	-12,17	-16,23	-24,60	-25,33
6.000	0,00	-8,83	-13,73	-22,07	-25,67
7.500	0,00	-9,22	-12,45	-15,33	-25,16
7.500	0,00	-12,17	-17,05	-21,81	-30,09
7.500	0,00	-22,85	-29,40	-32,03	-41,36
7.500	0,00	-12,48	-17,23	-28,33	-29,62
7.500	0,00	-14,70	-26,14	-33,38	-41,17
10.000	0,00	-20,25	-29,74	-34,72	-43,75
10.000	0,00	-15,48	-20,78	-36,47	-41,86
10.000	0,00	-16,38	-24,88	-34,07	-46,51
10.000	0,00	-27,25	-37,52	-56,15	-57,94
10.000	0,00	-17,17	-28,95	-40,17	-52,08
10.000 + VTF	0,00	3,06	7,29	-0,25	-3,01
10.000 + VTF	0,00	4,27	4,55	10,56	2,45
10.000 + VTF	0,00	10,33	21,04	16,62	10,61
10.000 + VTF	0,00	1,98	3,04	2,31	-8,26
10.000 + VTF	0,00	-2,27	4,82	3,60	-2,86

VTF – vermicomposto de torta de filtro

Fonte: autoria própria

Com estes dados, foi construído um histograma de distribuição normal. Com a normalidade dos resultados comprovada, foi possível realizar os demais testes estatísticos.

A análise de variância ANOVA foi realizada a fim de saber se os dados apresentados apresentam diferenças significativas entre si. A Tabela 33 apresenta o resumo dos dados obtidos para o conjunto de dados de biomassa aos 28 dias pelo teste ANOVA.

Tabela 33 – Resumo dos dados para o teste ANOVA para os dados de toxicidade envolvendo minhocas *Eisenia foetida* em formulação comercial de glifosato durante 28 dias, em solo natural.

natural.

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Dias	40	205485	5137,12	14154973,19
0	40	0	0	0
7	40	-100,66	-2,52	119,00
14	40	-253,41	-6,33	232,03
21	40	-502,37	-12,56	369,13
28	40	-789,39	-19,74	484,84

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F _{crít}
Entre grupos	882499175	5	176499835	74,81	1,41E-46	2,25
Dentro dos grupos	552090950	234	2359363			

SQ – soma dos quadrados
 GL – graus de liberdade
 MQ – média dos quadrados
 Fonte: autoria própria

Para a ANOVA, o valor mais importante a ser observado é o valor de P. Quando ele é $> 0,05$ (significância de 95%), quer dizer que a hipótese nula é mantida, ou seja, os resultados são diferentes entre si, ou seja, houve diferença entre os tratamentos (as diversas concentrações tiveram efeitos diferentes no desenvolvimento das minhocas), conforme já mencionado.

Uma vez confirmado que os dados obtidos pelo teste ANOVA são significantemente diferentes entre si, é necessário realizar o teste de Dunnett para saber qual ou quais tratamentos apresentaram efeitos diferentes do experimento referência.

A Tabela 34 mostra o teste de Dunnett realizado ao final dos 28 dias de experimento e a Figura 48 apresenta os valores percentuais para todos os tratamentos.

Tabela 34 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações da formulação comercial de glifosato, em solo natural.

Dados do processo

$\alpha = 0,05$

Hipótese Alternativa = Bilateral

Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
96	-42,17	-55,89	-28,44	9,45E-10
3.000	-46,59	-60,31	-32,87	1,56E-11
4.500	-42,77	-56,49	-29,05	2,86E-10
6.000	-56,21	-69,94	-42,49	2,15E-14
7.500	-55,88	-69,60	-42,16	2,05E-13
10.000	-70,82	-84,54	-57,10	0
10.000 + VTF	-22,61	-36,33	-8,89	5,37 E-4

VTF – vermicomposto de torta de filtro

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Figura 48 – Variação de biomassa média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Analizando a Figura 48 e a Tabela 34, pode-se perceber que todas as dosagens apresentaram comportamento diferente do experimento referência. No experimento onde foi aplicado o vermicomposto, nota-se que não houve ganho de biomassa, mas também não houve perda acentuada, o que evidencia uma possível adsorção do glifosato pelos sítios ativos do vermicomposto, como mencionado no Capítulo III. [120]

Aos 28 dias, observou-se mortalidade de organismos adultos a partir da concentração de 6.000 mg kg^{-1} . No mesmo período, observou-se perda de massa dos organismos adultos, em relação ao início do ensaio, para todos os tratamentos. A perda de massa foi maior conforme o aumento da concentração de glifosato no solo, à exceção do tratamento com vermicomposto.

Os organismos adultos sobreviventes apresentaram alterações morfológicas, principalmente afilamento e fragmentação. Alterações de comportamento (lentidão na resposta a estímulos mecânicos) também foram observadas. Essas observações relacionaram-se diretamente ao aumento da concentração do herbicida. A fim de reforçar a evidência de que é a partir da concentração de 6.000 mg kg^{-1} que o desenvolvimento das minhocas passa a ficar comprometido, foi calculado o percentual de mortalidade aos 28 dias, conforme a Figura 49. A Tabela 35 apresenta os resultados do teste de Dunnett, para mortalidade aos 28 dias.

Tabela 35 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de mortalidade percentual média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural.

Dados do processo

$\alpha = 0,05$

Hipótese Alternativa = Bilateral

Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
96	-2,34E-15	-6,48	6,48	1
3.000	0	-6	6	1
4.500	0	-6	6	1
6.000	16	10	22	1,94E-07
7.500	18	12	24	2,57E-08
10.000	16	10	22	4,55E-07
10.000 + VTF	4	-2	10	0,39

VTF – vermicomposto de torta de filtro

LI – limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Figura 49 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Em relação à biomassa, o teste de Dunnett também foi realizado para os 7 e 14 dias de experimento, conforme as Tabelas 36 e 37.

Tabela 36 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 7 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural.

Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
96	-2,01	-8,25	4,23	0,91
3.000	2,20	-4,04	8,44	0,87
4.500	-2,95	-9,19	3,28	0,65
6.000	-19,16	-25,40	-12,92	2,17E-09
7.500	-20,66	-26,90	-14,43	2,86E-10
10.000	-25,69	-31,92	-19,45	6,44E-15
10.000 + VTF	-2,91	-9,14	3,33	0,68

VTF – vermicomposto de torta de filtro

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Tabela 37 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural.

Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
96	-18,20	-28,17	-8,22	1,51E-04
3.000	-18,53	-28,51	-8,56	9,81E-05
4.500	-20,10	-30,08	-10,12	3,37E-05
6.000	-34,86	-44,84	-24,88	7,55E-11
7.500	-36,79	-46,77	-26,82	6,12E-12
10.000	-44,71	-54,69	-34,74	1,11E-16
10.000 + VTF	-8,19	-18,17	1,78529	0,14

VTF – vermicomposto de torta de filtro

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Analisando as Tabelas 36 e 37, observa-se que, nos primeiros 7 dias, até a concentração de 4.500 mg kg^{-1} não apresentou diferença significativa em relação à referência, ou seja, até essa data, o metabolismo das minhocas não sentiu os efeitos da alta concentração de glifosato. Passados mais 7 dias, pode-se observar que a única amostra que continuou com comportamento semelhante à referência foi a amostra de $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ + VTF, comportamento este que se manteve até o 28º dia.

Pelo teste de Dunnett observou-se que, nos primeiros 7 dias, as concentrações que apresentaram efeito significativamente diferente da referência foram justamente aquelas em que a mortalidade também foi significativamente diferente dela, o que mostra que a perda de biomassa e a mortalidade são fatores que estão relacionados.

Com esses testes, é possível perceber que o glifosato interfere no desenvolvimento das minhocas e que a presença de vermicomposto atenua essa interferência. García-Pérez e colaboradores (2012) ao avaliar minhocas presentes em cafezais contaminados por glifosato afirmam que as minhocas podem agir como indicadores de perturbação do solo, porém esse estudo deve ser feito em longo prazo, em escala de anos, a fim de esclarecer a relação do herbicida com alterações nas minhocas. [147]

4.4.2.3.1.a Modelo cinético de variação de biomassa

Analisando os dados de variação de biomassa, foi possível propor um modelo cinético de sua variação em relação às concentrações estudadas.

Para isso, foi calculado o coeficiente de crescimento (ou decrescimento) de massa de acordo com o modelo cinético de 1ª ordem, conforme a Equação 14

$$M_f = M_i e^{kt} \quad (14)$$

Onde: M_f : massa final (g);

M_i : massa inicial (g);

k: coeficiente de crescimento/decrescimento

t: tempo (dias)

Os resultados dos cálculos da constante de crescimento/decrescimento estão na Tabela 38.

Tabela 38 – Coeficiente de crescimento/decrescimento em relação às concentrações estudadas no experimento de toxicidade envolvendo formulação comercial do herbicida glifosato.

Concentração (mg kg ⁻¹)	k	k + 1
0*	0,0069	1,0069
96	-0,008	0,992
3000	-0,011	0,989
4500	-0,008	0,992
6000	-0,014	0,986
7500	-0,014	0,986
10000	-0,023	0,977
10000 + VTF	0,0056	1,0056

* Para facilitar os cálculos, o experimento de referência foi chamado de zero (0)

VTF: vermicomposto de torta de filtro

Fonte: autoria própria

Pela Tabela 38, percebe-se que o coeficiente foi positivo (crescimento) apenas no experimento de referência e no experimento envolvendo a adição de vermicomposto. Para a proposta da função de decréscimo de massa foram utilizadas as sete primeiras concentrações, conforme Figura 50.

Figura 50 – Função de decréscimo de biomassa dos experimentos de toxicidade envolvendo formulação comercial do herbicida glifosato.

A Figura 50 mostra que a função de decréscimo de biomassa obedece a função $y = 0,9991 e^{-2E-06x}$. A faixa roxa indica que acima dela, estão os pontos onde houve ganho de biomassa e abaixo dela, houve perda. Como a proposta do experimento foi simular contaminações por derramamento do herbicida, não foi possível perceber decréscimo discreto na função proposta.

Na Tabela 38, pode-se perceber que, o experimento envolvendo a adição de vermicomposto de torta de filtro mostrou um acréscimo na biomassa das minhocas. Plotando o coeficiente obtido neste experimento na função obtida, obtém-se uma concentração teórica de 3242,40 mg kg⁻¹ (representado por uma estrela na Figura 50). A adição de vermicomposto de torta de filtro representou um aumento 2,93% na biomassa das minhocas.

4.4.2.3.2 Deltametrina

A Tabela 39 apresenta os valores de variação de biomassa percentual na presença do piretróide deltametrina (sem e com o princípio ativo).

Tabela 39 – Variação de biomassa percentual de cada réplica do teste de toxicidade envolvendo minhocas *Eisenia foetida* em formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo durante 28 dias, em solo natural.

Concentração (mg kg ⁻¹)	Tempo (dias)									
	0		7		14		21		28	
	SEM DELTA	COM DELTA	SEM DELTA	COM DELTA	SEM DELTA	COM DELTA	SEM DELTA	COM DELTA	SEM DELTA	COM DELTA
0	0,00	0,00	6,04	6,04	19,84	19,84	21,52	21,52	24,42	24,42
0	0,00	0,00	4,39	4,39	13,09	13,09	0,85	0,85	5,39	5,39
0	0,00	0,00	9,41	9,41	21,13	21,13	6,12	6,12	15,06	15,06
0	0,00	0,00	9,61	9,61	12,65	12,65	26,56	26,56	21,70	21,70
0	0,00	0,00	5,20	5,20	16,84	16,84	19,73	19,73	19,64	19,64
5	0,00	0,00	4,77	7,38	6,81	2,33	4,69	-13,82	9,58	-19,43
5	0,00	0,00	13,03	7,53	13,94	2,42	17,69	-19,86	24,91	-24,08
5	0,00	0,00	10,40	7,51	21,13	-3,27	22,01	-13,40	29,36	-24,89
5	0,00	0,00	4,52	4,30	-7,47	-4,33	-28,43	-18,56	-35,90	-28,81
5	0,00	0,00	10,63	5,65	14,52	2,70	16,66	-13,49	20,38	-31,67
100	0,00	0,00	10,82	-5,16	8,34	-11,93	-3,14	-14,91	-14,72	-34,81
100	0,00	0,00	8,89	-11,61	9,45	-20,95	3,21	-29,12	-5,40	-39,89
100	0,00	0,00	7,29	-13,92	-2,22	-19,61	-7,83	-23,17	-13,24	-34,50
100	0,00	0,00	17,62	-4,61	8,71	-14,50	4,31	-20,10	-3,15	-26,88
100	0,00	0,00	8,70	-2,87	5,60	-16,52	-1,01	-27,48	-4,30	-29,99
250	0,00	0,00	-17,08	-9,30	-23,85	-19,44	-34,86	-34,15	-40,34	-38,98
250	0,00	0,00	-9,08	-8,26	-17,62	-14,60	-23,89	-24,18	-29,73	-31,15
250	0,00	0,00	-9,62	-10,26	-29,63	-21,07	-34,55	-25,87	-25,75	-31,60
250	0,00	0,00	-57,24	-10,87	-75,19	-17,48	-67,15	-25,98	-69,82	-32,44
250	0,00	0,00	-5,74	-7,40	-17,16	-14,57	-23,11	-28,32	-28,40	-32,92
500	0,00	0,00	-7,48	-8,70	-14,36	-16,68	-22,13	-21,43	-31,96	-25,95
500	0,00	0,00	-16,78	-8,92	-23,24	-17,18	-28,85	-22,88	-33,92	-28,03
500	0,00	0,00	-15,20	-14,53	-27,25	-21,50	-38,04	-30,87	-42,76	-35,13

(continua)

500	0,00	0,00	-10,04	-10,54	-16,84	-16,65	-22,41	-23,82	-27,90	-27,58
500	0,00	0,00	-8,65	-12,01	-15,18	-25,52	-23,51	-33,91	-25,53	-36,58
500 + VTF	0,00	0,00	28,54	-8,44	23,84	-17,25	13,63	-21,34	17,54	-29,17
500 + VTF	0,00	0,00	27,72	-6,75	19,75	-20,42	13,78	-24,94	8,06	-30,04
500 + VTF	0,00	0,00	42,06	-6,16	36,67	-13,20	27,99	-22,08	19,65	-33,38
500 + VTF	0,00	0,00	37,32	-9,24	31,10	-10,99	27,10	-14,37	22,74	-18,97
500 + VTF	0,00	0,00	38,62	-6,89	32,30	-12,26	22,26	-12,86	15,08	-28,80
500 + VBL	0,00	0,00	35,85	-7,96	31,98	-16,61	22,48	-27,48	17,30	-32,85
500 + VBL	0,00	0,00	43,86	-5,80	41,22	-11,65	33,22	-16,89	26,02	-31,00
500 + VBL	0,00	0,00	47,45	-6,54	44,30	-22,53	36,99	-32,64	28,29	-45,84
500 + VBL	0,00	0,00	28,54	-4,33	43,64	-15,31	36,20	-24,30	30,22	-28,91
500 + VBL	0,00	0,00	27,72	-5,23	29,45	-11,74	26,39	-33,65	22,15	-30,14

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Com estes dados, foi construído um histograma de distribuição normal. Com a normalidade dos resultados comprovada, foi possível realizar os demais testes estatísticos.

A análise de variância ANOVA é realizada a fim de saber se os dados apresentam diferenças significativas entre si. A Tabela 40 mostra o cálculo de ANOVA para os dados dos testes envolvendo a avaliação da formulação comercial de deltametrina (sem e com princípio ativo).

Tabela 40 – Resumo dos dados para o teste ANOVA para os dados de toxicidade envolvendo a formulação comercial de deltametrina (sem com princípio ativo)

SEM DELTAMETRINA						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
Dias	35	9290	265,43	48877,02		
0	35	0	0	0		
7	35	357,06	10,20	507,66		
14	35	236,28	6,75	663,59		
21	35	44,48	1,27	669,61		
28	35	-55,30	-1,58	715,28		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F _{crít}
Entre grupos	2007086,95	5	401417,39	46,83	4,29E-32	2,26
Dentro dos grupos	1748727,23	204	8572,19			

COM DELTAMETRINA						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
Dias	35	9290	265,43	48877,02		
0	35	0	0	0		
7	35	-139,26	-3,98	54,12		
14	35	-336,78	-9,62	167,04		
21	35	-621,08	-17,74	233,76		
28	35	-838,21	-23,95	324,07		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F _{crít}
Entre grupos	2243145,03	5	448629,01	54,21	1,24E-35	2,26
Dentro dos grupos	1688304,23	204	8276,00			

SQ – soma dos quadrados
GL – graus de liberdade
MQ – média dos quadrados
Fonte: autoria própria

De acordo com a Tabela 40, como o valor de P é bem menor que 0,05, (significância de 95%), quer dizer que a hipótese nula é mantida, ou seja, os resultados são diferentes entre si, logo, houve diferença entre os tratamentos (as diversas concentrações tiveram efeitos diferentes no desenvolvimento das minhocas) para ambos os experimentos.

A Tabela 41 mostra o teste de Dunnett realizado ao final dos 28 dias de experimento e a Figura 51 apresenta os valores de variação percentual para todos os tratamentos.

Tabela 41 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de biomassa percentual média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, sem e com princípio ativo, em solo natural.

SEM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência mg kg⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	-7,57	-30,38	15,23	0,87
100	-25,40	-48,21	-2,59	0,02
250	-56,05	-78,86	-33,24	1,27E-06
500	-49,65	-72,46	-26,85	6,17E-06
500 + VTF	-0,63	-23,43	22,18	0,99
500 + VBL	7,56	-15,25	30,36	0,87
COM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência mg kg⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	1,76	-7,13	10,65	0,99
100	-5,68	-14,57	3,21	0,34
250	-5,88	-14,77	3,01	0,30
500	-3,12	-12,01	5,77	0,84
500 + VTF	-0,54	-9,43	8,35	0,99
500 + VBL	-6,21	-15,10	2,68	0,26

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Figura 51 – Perda de biomassa média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Para os experimentos sem a presença do princípio ativo, ao final de 28 dias, observou-se perda de biomassa dos organismos adultos, em relação ao início do ensaio, a partir da concentração de 100 mg kg⁻¹. Houve ganho de biomassa apenas nos experimentos com adição de vermicomposto. Nos experimentos envolvendo a formulação completa, por outro lado, em todos os experimentos houve perda de biomassa.

Shi e colaboradores (2007) afirmam que mudanças na biomassa podem representar um indicador de stress químico, ou seja, o contaminante estudado pode afetar quimicamente a dinâmica de obtenção de energia do ser vivo e, finalmente, inibir seu crescimento. A deltametrina inibe o crescimento das minhocas, e isso pode estar relacionado à estratégia de sobrevivência natural: a redução da ingestão de alimentos, para evitar as toxinas. Esta estratégia é comumente usada em minhocas para evitar o envenenamento com metais pesados e produtos químicos orgânicos. [145]

Os organismos adultos sobreviventes apresentaram alterações morfológicas, principalmente afilamento e fragmentação. Alterações de comportamento (lentidão na resposta a estímulos mecânicos) também foi observada. Essas observações relacionaram-se diretamente ao aumento da concentração do piretróide. Também foi calculado o percentual de mortalidade aos 28 dias, conforme a Figura 52. A Tabela 42 apresenta o resultado do teste de Dunnett, para mortalidade aos 28 dias.

Tabela 42 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de mortalidade percentual média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem princípio ativo, em solo natural.

SEM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	-7,941E-17	-3,577	3,577	1
100	-2,320E-16	-3,577	3,577	1
250	6	2,423	9,577	5E-04
500	10	6,423	13,577	8,567E-08
500 + VTF	3,854E-16	-3,577	3,577	1
500 + VBL	3,855E-16	-3,577	3,577	1
COM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	12	4,85	19,15	5,00E-04
100	8	0,85	15,15	2,36E-02
250	8	0,85	15,15	2,39E-02
500	8	0,85	15,15	2,37E-02
500 + VTF	8	0,85	15,15	2,37E-02
500 + VBL	28	20,85	35,15	5,09E-13

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Figura 52 – Mortalidade média (n=5) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Aos 28 dias, para os experimentos envolvendo apenas a presença dos dispersantes da formulação comercial, observou-se mortalidade de organismos adultos apenas nas concentrações de 250 e 500 mg kg⁻¹. Já nos experimentos envolvendo a formulação completa houve perda de biomassa em todas as concentrações (exceto a referência), o que mostra que a presença da deltametrina altera todo o comportamento das minhocas. E percebe-se também que os percentuais de mortalidade foram obtidos nos experimentos onde houve maior perda de biomassa.

O comportamento da variação da biomassa também foi avaliado no 7º e no 14º dias. As Tabelas 43 e 44 mostram os resultados obtidos no teste de Dunnett nos dois períodos.

Tabela 43 - Resumo dos dados para o teste de Dunnett para os dados de variação de biomassa média percentual (n=5) envolvendo minhocas *Eisenia foetida* em gradiente de concentração de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, durante os 7 primeiros dias, em solo natural.

SEM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	1,74	-14,03	17,51	0,99
100	3,73	-12,03	19,50	0,98
250	-26,68	-42,45	-10,91	4,07E-04
500	-18,56	-34,33	-2,79	1,63E-02
500 + VTF	27,92	12,15	43,69	2,10E-04
500 + VBL	34,75	18,98	50,52	9,36E-06
COM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	-0,46	-4,72	3,81	0,99
100	-14,56	-18,83	-10,30	1,36E-10
250	-16,15	-20,41	-11,88	9,49E-13
500	-17,87	-22,14	-13,60	2,76E-13
500 + VTF	-14,43	-18,69	-10,16	1,76E-10
500 + VBL	-12,90	-17,17	-8,64	4,60E-07

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Tabela 44 – Resumo dos dados para o teste de Dunnett para os dados de variação de biomassa média percentual (n=5) envolvendo minhocas *Eisenia foetida* em gradiente de concentração de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, durante os 14 primeiros dias, em solo natural.

SEM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	-6,92	-26,21	12,37	0,83
100	-10,73	-30,02	8,56	0,47
250	-49,40	-68,69	-30,11	5,49E-07
500	-36,08	-55,37	-16,79	9,58E-05
500 + VTF	12,03	-7,26	31,31	0,36
500 + VBL	21,41	2,12	40,70	2,52E-02
COM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	4,91	-1,55	11,37	0,19
100	-11,77	-18,23	-5,31	1,00E-04
250	-12,49	-18,95	-6,03	1,00E-04
500	-14,57	-21,02	-8,11	4,26E-06
500 + VTF	-9,89	-16,35	-3,43	1,20E-03
500 + VBL	-10,63	-17,09	-4,17	7,00E-04

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Como se pode observar, nos primeiros 7 dias, para os experimentos envolvendo apenas os dispersantes, a perda de biomassa começou a ser notada a partir da concentração de 250 mg kg⁻¹ e nos experimentos envolvendo a formulação completa, a partir de 100 mg kg⁻¹, o que mostra mais uma vez que deltametrina interfere no desenvolvimento das minhocas de maneira mais sensível que seus dispersantes.

Aos 14 dias, observou-se o mesmo comportamento. O que se pode perceber que é, os resultados obtidos no ensaio de biomassa completo (28 dias) já eram sentidos logo na primeira semana.

4.4.2.3.2.a Modelo cinético de variação de biomassa

Os coeficientes de crescimento/decrescimento de massa foram calculados de acordo com o proposto no item 4.4.2.3.1.a.

Os resultados dos cálculos da constante de crescimento/decrescimento estão na Tabela 45.

Tabela 45 – Coeficiente de crescimento/decrescimento em relação às concentrações estudadas no experimento de toxicidade envolvendo formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo.

Concentração (mg kg ⁻¹)	k		k + 1	
	SEM DELTA	COM DELTA	SEM DELTA	COM DELTA
0*	0,0054	0,0054	1,0054	1,0054
5	0,0027	-0,012	1,0027	0,988
100	-0,004	-0,014	0,996	0,986
250	-0,018	-0,015	0,982	0,985
500	-0,014	-0,013	0,986	0,987
500 + VTF	0,0028	-0,011	1,0028	0,989
500 + VBL	0,0052	-0,015	1,0052	0,985

* Para facilitar os cálculos, o experimento de referência foi chamado de zero (0)

VTF: vermicomposto de torta de filtro

VBL: vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Pela Tabela 45, percebe-se que nos experimentos envolvendo apenas os dispersantes da formulação comercial de deltametrina, o coeficiente foi positivo (crescimento) no experimento de referência, em 5 mg kg⁻¹ e nos experimento envolvendo a adição de vermicomposto. Já para os experimentos envolvendo a formulação completa, o ganho de biomassa foi apenas no experimento de referência. Para a proposta das funções de decréscimo de massa foram utilizadas as cinco primeiras concentrações, conforme Figura 53.

Figura 53 – Função de decréscimo de biomassa dos experimentos de toxicidade envolvendo formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo.

A Figura 53 mostra que, para os experimentos envolvendo apenas os dispersantes da formulação comercial de deltametrina, a função de decréscimo de biomassa obedece a função $y = 0,985 + 0,02e^{-0,41x}$ e para os experimentos envolvendo a formulação completa, a função é $y = -5,84 + 6,84e^{-1,3x}$. Observando a faixa roxa, para os experimentos envolvendo os dispersantes, a amostra referência e a de 5 mg kg^{-1} apresentaram ganho de biomassa. Já para os experimentos envolvendo formulação completa, apenas a referência apresentou ganho de biomassa. Com a proposta do modelo cinético teórico, é possível perceber que, para uma mesma concentração (até 200 mg kg^{-1}), a formulação completa apresenta maior perda de biomassa. Acima desse ponto, o comportamento se inverte. Essa inversão pode estar relacionada ao alto desvio padrão que os experimentos possuem, já que foram avaliadas 50 minhocas por concentração e essa população é grande.

Na Tabela 45, pode-se perceber que, o experimento envolvendo a adição de vermicomposto de torta de filtro e bagaço de laranja mostrou um acréscimo na biomassa das minhocas apenas nos experimentos envolvendo os dispersantes. Plotando o coeficiente obtido neste experimento na função obtida, obtém-se uma concentração teórica de $0,28 \text{ mg kg}^{-1}$ para VTF e $0,52$

mg kg⁻¹ para VBL. A adição de vermicompostos representou um aumento médio de 1,8% na biomassa das minhocas.

4.4.2.4 Ensaios de reprodução

Santadino e colaboradores (2014) afirmam que o parâmetro mais sensível para a análise de toxicidade é a avaliação da transição do organismo jovem para o adulto, ou seja, a avaliação do ensaio de reprodução. Qualquer alteração nessa dinâmica sugere fortes efeitos subletais e pode conduzi-las à extinção local da população. [146]

4.4.2.4.1 Glifosato

De acordo com o estabelecido pela ISO 11268-2 [133], para que o teste de reprodução seja válido, é necessário que no teste de solo referência haja, no mínimo, 30 juvenis em cada replicata. A Tabela 46 apresenta os valores obtidos no ensaio de reprodução.

Tabela 46 – Resultado do teste de reprodução para minhocas *Eisenia foetida*, ao final de 56 dias, na presença de gradiente de formulação comercial de herbicida glifosato, em solo natural.

Tratamento	Juvenis	Ovos
Solo referência	35	43
96 mg kg⁻¹	2	75
3.000 mg kg⁻¹	1	58
4.500 mg kg⁻¹	1	46
6.000 mg kg⁻¹	1	52
7.500 mg kg⁻¹	1	39
10.000 mg kg⁻¹	1	28
10.000 mg kg⁻¹ + VTF	10	26

VTF – vermicomposto de torta de filtro

Fonte: autoria própria

Ao se observar a Tabela 46, percebe-se que o glifosato apresenta efeito deletério ao desenvolvimento das minhocas, visto que apenas no experimento referência houve a presença de juvenis em número significativo. Houve diferença significativa também no experimento em que foi adicionado

vermicomposto, mostrando mais uma evidência de que ele melhora o desenvolvimento das minhocas.

As Tabelas 47 e 48 mostram o teste de Dunnett para avaliação das diferenças quanto à presença de minhocas juvenis e ovos. Vale ressaltar que, para esses testes, o período total de execução foi de 56 dias.

Tabela 47 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (minhocas juvenis) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações da formulação comercial de glifosato, em solo natural.

Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
96	-32,8	-35,82	-29,78	0
3000	-34	-37,02	-30,98	0
4500	-34,2	-37,22	-31,18	0
6000	-34,2	-37,22	-31,18	0
7500	-34,2	-37,22	-31,18	0
10000	-34,2	-37,22	-31,18	0
10000 + VTF	-23,4	-26,42	-20,38	0

VTF – vermicomposto de torta de filtro

LI – limite inferior

LS – Limite superior

Fonte: autoria própria

Tabela 48 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (ovos) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural.

Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
96	32	30,81	33,19	0
3000	14,8	13,61	15,99	0
4500	3	1,81	4,19	2,81E-07
6000	9	7,81	10,19	0
7500	-4	-5,19	-2,81	2,51E-11
10000	-15	-16,19	-13,81	0
10000 + VTF	-17	-18,19	-15,81	0

VTF – vermicomposto de torta de filtro

LI – Limite inferior

LS – Limite superior
Fonte: autoria própria

A Figura 54 apresenta o gráfico com todos os dados de reprodução.

Figura 54 – Reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*), juvenis e ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

É possível perceber que a adição de glifosato interfere na produção de ovos, principalmente no impedimento destes eclodirem, já que o número de minhocas juvenis decresce sensivelmente com a adição do herbicida. Nota-se também que a adição de vermicomposto é capaz de indisponibilizar o herbicida no ambiente, já que o número de juvenis tem ligeiro aumento na amostra onde ele está presente. É interessante destacar que, em ensaios de reprodução, Correia e Moreira (2010) não encontraram minhocas juvenis em nenhum experimento avaliando concentrações de glifosato até 1000 mg kg⁻¹. [108] García-Torres e colaboradores (2014), em outro estudo, encontraram significativa diminuição de juvenis a partir de 5000 mg kg⁻¹. [148]

4.4.2.4.2 Deltametrina

A Tabela 49 apresenta os resultados obtidos para os testes de reprodução (presença de ovos e juvenis) dos experimentos envolvendo a formulação comercial de deltametrina.

Tabela 49 – Resultado do teste de reprodução para minhocas *Eisenia foetida*, ao final de 56 dias, na presença de gradiente de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural.

Tratamento	Juvenis		Ovos	
	SEM DELTA	COM DELTA	SEM DELTA	COM DELTA
Referência	37	35	46	43
5 mg kg⁻¹	15	0	29	49
100 mg kg⁻¹	2	0	31	28
250 mg kg⁻¹	1	0	23	20
500 mg kg⁻¹	3	0	19	20
500 mg kg⁻¹ + VTF	177	0	27	25
500 mg kg⁻¹ + VBL	124	0	62	14

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Ao se observar a Tabela 49 percebe-se que a formulação comercial sem o princípio ativo apresenta algum efeito deletério ao desenvolvimento das minhocas, já que o número de juvenis diminuiu conforme o aumento da concentração do dispersante. É interessante notar que onde houve adição de vermicomposto, a reprodução superou 100 juvenis. Por outro lado, nos experimentos com a formulação completa, não houve presença de juvenis em nenhum dos experimentos, inclusive com vermicompostos. Nota-se que a presença da deltametrina interfere muito no desenvolvimento das minhocas.

As Tabelas 50 e 51 mostram o teste de Dunnett a fim de se confirmar a diferença que realmente é significativa no que se refere à presença de minhocas juvenis e ovos (testes para 56 dias).

Tabela 50 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (minhocas juvenis) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural.

SEM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	-20	-23,28	-16,72	0
100	-33	-36,28	-29,72	0
250	-34	-37,28	-30,72	0
500	-31,4	-34,68	-28,11	0
500 + VBL	89	85,71	92,29	0
500 + VTF	142	138,71	145,28	0
COM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	-35	-35,46	-34,54	0
100	-35	-35,46	-34,54	0
250	-35	-35,46	-34,54	0
500	-35	-35,46	-34,54	0
500 + VTF	-35	-35,46	-34,54	0
500 + VBL	-35	-35,46	-34,54	0

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Tabela 51 – Valores de P obtidos para o teste de Dunnett para os dados de reprodução (ovos) de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem e com princípio ativo, em solo natural.

SEM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	-14	-15,32	-12,69	0
100	-12,6	-13,92	-11,28	0
250	-20	-21,32	-18,68	0
500	-24	-25,32	-22,68	0
500 + VTF	18,4	17,08	19,72	0
500 + VBL	-16	-17,32	-14,68	0
COM DELTAMETRINA				
Dados do processo				
$\alpha = 0,05$				
Hipótese Alternativa = Bilateral				
Diferença entre níveis (comparado ao solo referência – mg kg ⁻¹)	Média	LI	LS	P-valor
5	6	4,63	7,37	1,16E-12
100	-14,4	-15,77	-13,03	0
250	-22,4	-23,77	-21,03	0
500 mg kg ⁻¹	-22,4	-23,77	-21,03	0
500 mg kg ⁻¹ + VBL	-29	-30,37	-27,63	0
500 mg kg ⁻¹ + VTF	-18	-19,37	-16,63	0

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

As Figuras 55 e 56 apresentam os gráficos com todos os dados de reprodução (presença de ovos e juvenis).

Figura 55 – Reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*) (presença de juvenis), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina sem princípio ativo, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Figura 56 – Reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*) (presença de ovos), aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Pelas Figuras 55 e 56 é possível perceber que a formulação comercial sem o princípio ativo apresenta pouca oscilação no que diz respeito à produção de ovos, mas a eclosão diminui conforme aumenta sua concentração. Percebe-se também que a adição de vermicomposto melhorou muito o desenvolvimento das minhocas, tendo o número de juvenis muito superior ao experimento de referência.

A formulação comercial de deltametrina por sua vez, mostrou oscilação no que diz respeito à produção de ovos e, principalmente, ela teve grande interferência na reprodução das minhocas, mesmo nas amostras em que houve a adição de vermicomposto, o que indica que a quantidade adicionada não foi suficiente para neutralizar o efeito deletério do piretróide.

Após a realização dos experimentos de toxicidade, foi possível notar que a formulação comercial de deltametrina tem efeito tóxico muito pronunciado e a adição de matéria orgânica não foi suficiente para vencer essa toxicidade.

Em alguns testes, ficou evidente que a toxicidade da deltametrina é muito maior. Nos ensaios de reprodução, nos testes envolvendo apenas os dispersantes, nas amostras em que houve adição de vermicomposto de bagaço de laranja e de torta de filtro, houve reprodução significativa, porém, com a presença de deltametrina, não houve juvenis, o que mostra a toxicidade crônica do piretróide. Ao calcular a CL_{20} , também ficou evidente essa grande diferença, já que para os dispersantes, esse valor ficou na ordem de 10^7 e para a deltametrina, na ordem de 10^{-1} , ou seja, uma quantidade muito pequena do xenobiótico já provoca mortandade de 20% dos indivíduos.

É interessante mais uma vez, reforçar a afirmação dita por Pereira e colaboradores (2014). [120] A deltametrina é um piretróide pouco polar, logo sua interação com os sítios ativos do vermicomposto é menos eficiente.

4.5 Conclusões

As minhocas responderam de maneiras distintas à exposição ao glifosato e à deltametrina comerciais e as características destes xenobióticos podem ter sido relevantes nesse comportamento. O glifosato é um herbicida e a deltametrina, um inseticida, com ação direta no sistema nervoso dos seres vivos. O tamanho das moléculas também influencia em sua degradação, bem como as distintas polaridades, fazendo com que a interação destas com os sítios ativos do vermicomposto se deem de maneiras distintas.

Apesar de o glifosato ser um herbicida (ou seja, o organismo alvo são plantas), os resultados mostraram que há efeito tóxico em minhocas e que não devem ser ignorados por aqueles que o manipulam diariamente. O ideal seria evitar seu uso. Para estudos futuros, é necessário completar os testes de toxicidade para o glifosato, usando formulação apenas com a presença dos dispersantes, para se ter maior certeza sobre a real toxicidade do herbicida.

Em relação ao método proposto para remediação de solos contaminados com glifosato, a adição de 3% de vermicomposto foi suficiente para a visualização da melhora do desenvolvimento das minhocas, o mesmo não ocorrendo com os experimentos envolvendo deltametrina. É interessante, então, estudar outras concentrações de vermicomposto (4, 5, ou 10%) a fim de saber se uma dosagem maior seria capaz de remediar solos contaminados. Fica evidente também que a toxicidade da deltametrina é muito maior que a dos dispersantes presentes em sua formulação comercial.

O estudo da toxicidade de um xenobiótico é importante para que se tenha real dimensão do impacto da contaminação deste no solo e nos seres vivos.

Capítulo V

A interação da deltametrina e do glifosato com os ácidos húmicos

5.1 Introdução

5.1.1 Substâncias húmicas

A matéria orgânica tem influência em todas as características físicas e químicas do solo, e pode ser dividida em dois grandes grupos: as substâncias não húmicas e as húmicas. O primeiro grupo é formado por produtos de decomposição orgânica (proteínas, aminoácidos, carboidratos, resinas, ligninas etc.) e possuem propriedades químicas e físicas definidas. Já o segundo grupo é representado pelas substâncias húmicas propriamente ditas e são conhecidas como a fração mais importante da matéria orgânica do solo. [110], [149]

As substâncias húmicas (SH) são um dos mais importantes grupos de biomoléculas e não pertencem a uma categoria química única. Eles são definidos pela combinação de todos os aspectos conhecidos de suas propriedades, incluindo o seu processo de isolamento. A definição mais comum é que as SH são uma categoria geral de ocorrência natural, de coloração escura, elevada massa molecular aparente e propriedades refratárias. [150]

As substâncias húmicas são formadas por meio de um processo de humificação, como resultado da decomposição e transformação de biomoléculas e são formados a partir de organismos mortos como resultado da ação de microrganismos [150] e podem ser separadas de acordo com sua solubilidade em meios ácido ou básico. São elas: humina – fração insolúvel em meio aquoso, independente da acidez, ácidos húmicos – insolúvel em meio ácido diluído e ácidos fúlvicos – solúvel em meio alcalino e ácido. [110], [151]

As SH consistem de um esqueleto de unidades alquil/aromáticas ligadas principalmente por grupos oxigênio e nitrogênio, onde os principais grupos funcionais são ácidos carboxílicos e fenólicos, grupos hidroxilo alcoólicos, cetonas, e grupos de quinona. Acredita-se que se formam a partir da oxidação de biopolímeros no ambiente, assim como reações de condensação envolvendo moléculas orgânicas de baixa massa molecular. [151]

5.1.2 Os ácidos húmicos e sua interação com pesticidas

Os ácidos húmicos (AH) têm como principal habilidade interagir com argilas minerais e compostos orgânicos. São os principais constituintes do húmus natural, por apresentarem-se em maior quantidade. Podem interagir com os pesticidas em diferentes modos, tais como adsorção via ligação iônica, ligação de hidrogênio, transferência de carga, ligação covalente e ligações van der Waals. [152]

Outros modos de interação entre ácidos húmicos e pesticidas incluem efeitos catalíticos na hidrólise e reações de desalquilação, efeitos de fotossensibilização e efeitos de solubilização. Estes processos conduzem à formação de intermediários ou de produtos de degradação, tendo mobilidade, toxicidade e persistência que são diferentes daqueles que são obtidos na ausência de substâncias húmicas e que podem influenciar a especiação de pesticidas, em particular, a sua partição, no sistema solo-água-organismo. [81] Esses modos serão detalhados no Capítulo V.

O conhecimento da natureza química, reatividade e propriedades dos AH e dos principais materiais que interagem com os pesticidas no solo é extremamente importante para determinar o modo e extensão da interação destes com o sistema. A adsorção de pesticidas sobre o solo dificulta a determinação de resíduos de pesticidas no solo e na água [81]. Assim, é necessário desenvolver novas metodologias que levem em consideração estes aspectos.

5.1.3 Técnicas espectroscópicas

As análises espectroscópicas tem ampla utilidade no estudo da matéria orgânica do solo. Técnicas como a espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e fluorescência de luz UV-Visível fornecem informações quanto aos grupos funcionais constituintes da matéria orgânica.

4.1.3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica antiga e eficiente para a identificação de tipos de ligações químicas na molécula. Uma das vantagens da FTIR é a sua capacidade para obter espectros de uma vasta gama de compostos diferentes. [153]

A técnica é classificada como uma espectroscopia de absorção, em que a energia absorvida pelas moléculas encontra-se na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Nessa região do espectro, a energia usada permite distinguir as vibrações moleculares de vários grupos funcionais. A região de maior interesse é de 4000 a 400 cm^{-1} . [55]

O espectro de infravermelho representa a molécula como um todo, mas há certos grupos funcionais que apresentam bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. Sendo assim, é possível elucidar características estruturais da molécula estudada.

Segundo Stevenson (1994) [154], FTIR permite obter informações sobre a natureza, reatividade e arranjo estrutural dos grupos funcionais presentes nas substâncias húmicas.

A técnica se baseia no fato de que os diversos tipos de ligações químicas existentes nas moléculas absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho, em comprimentos de onda característicos e, como consequência, os átomos envolvidos em diferentes estados vibracionais. Dentre os tipos fundamentais de vibrações moleculares estão os estiramentos simétrico e assimétrico, deformação angular, torção (twist), balanço (wag) e rotação. Vibrações de estiramento são mais energéticas e ocorrem, portanto, em frequências superiores às vibrações de deformação. [55], [155]

A base da instrumentação é submeter a amostra a uma energia na região do infravermelho. O feixe de energia atravessa uma câmara para controlar a quantidade de energia irradiada na amostra. O feixe de infravermelho entra no interferômetro gerando um sinal. Além disso, a energia do feixe de infravermelho entra no compartimento onde é transmitida ou refletida para fora da superfície da amostra, em função do tipo de análise a ser

realizada. Finalmente, o feixe passa para o detector para a medição final e o sinal medido é digitalizado e enviado de volta para o computador onde ocorre a transformada de Fourier, como mostrado na Figura 57. [55], [153]

Figura 57 – Esquema de funcionamento de espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier.

Fonte: SANTOS et al, 2010. [153]

Os principais grupos de absorção no infravermelho (região 400 – 4000 cm^{-1}) nas substâncias húmicas são observados na Tabela 52:

Tabela 52 – Bandas de absorção dos principais grupos funcionais no espectro de infravermelho médio.

Região (cm⁻¹)	Origem
3380	Estiramento OH do grupo fenólico (contribuição de OH alifático), H ₂ O e possivelmente NH
3030	Estiramento CH aromático
2930	Estiramento CH assimétrico
2840	Estiramento CH simétrico
2600	Estiramento OH de H ligado a –COOH
1720	Estiramento –C=O de -COOH
1610	Estiramento C=C aromático e/ou estiramento –COO ⁻ assimétrico
1520 - 1525	Estiramento C=C aromático, deformação N–H e estiramento C=N de amidas
1450	Deformação –CH de CH ₃ e dobramento –CH e –CH ₂
1350	Estiramento –COO simétrico e/ou dobramento –CH de alifáticos
1270	Estiramento –C–O de fenólico
1225	Estiramento –C–O de deformação OH de -COOH
1170	Estiramento –C–OH de alifáticos OH
1050 e 1040	Estiramento –C–O de polissacarídeos ou derivados de polissacarídeos e Si-O de impurezas silicatadas
830	Vibração CH fora do plano. Impurezas argilosas.
775	Vibração CH fora do plano

Fonte: NIEMEYER et al, (1992). [156]

As análises de FTIR têm sido usadas para identificar grupos funcionais como: carboxila, amina, hidroxila, carbonila e outros. Os espectros de ácidos húmicos são relativamente simples, tendo poucas bandas de absorção e alargadas. [157]

4.1.3.2 Espectroscopia no Ultravioleta – Visível (UV-Vis)

O conhecimento da absorção de luz pela matéria é a forma mais usual de determinar a concentração de compostos presentes em solução. A espectroscopia no ultravioleta visível (UV/Vis) envolve a espectroscopia de fótons. Ela utiliza luz na faixa do visível, do ultravioleta (UV) próximo e do infravermelho próximo. Nessas faixas de energia as moléculas sofrem transições eletrônicas moleculares. [55]

A absorção de radiação é resultado das transições eletrônicas de cromóforos que apresentam elétrons livres (como os oxigenados ou

nitrogenados, por exemplo). Quando recebem esse tipo de radiação, as moléculas sofrem transições eletrônicas, saindo do menor estado energético (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado). [55]

Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma solução com moléculas absorventes, parte da luz é absorvida pela solução e o restante é transmitido. A absorção de luz depende basicamente da concentração das moléculas absorventes e da espessura da solução – caminho óptico. [155] É uma técnica muito utilizada devido ao fácil manuseio, à rapidez e ao baixo custo operacional. Porém possui alto limite de detecção e os espectros correspondem a um gráfico de frequência ou comprimento de ondas de absorção, relacionada com a intensidade de absorção medida em transmitância ou absorbância, conforme mostrado na Figura 58. Essa técnica é largamente utilizada em estudos com substâncias húmicas de solo para avaliar o grau de humificação, principalmente de ácidos fúlvicos ou húmicos. [158]

Figura 58 – Esquema representativo de um espectrômetro de UV-Vis.

Fonte: CANELLAS et al (2005). [158]

Hoje, a espectroscopia de UV-Vis não é a única responsável pela elucidação de modelos estruturais ou de reatividade química, mas foi a primeira técnica a criar o conceito de grau de humificação de substâncias húmicas. Os primeiros trabalhos relacionando coloração escura com evolução das substâncias húmicas são da década de 1950. Hoje, novos conceitos foram incorporados com o desenvolvimento de outras técnicas espectroscópicas, porém há uma persistência do uso da relação E_4/E_6 e consolidação do uso da fluorescência como uma técnica sensível para avaliar tanto o grau de

humificação como a capacidade das substâncias húmicas em formar complexos com íons. [158]

No caso das substâncias húmicas, que contém muitos grupos aromáticos, as moléculas absorvem luz no UV e deixam o espectro com pouca resolução, consequentemente, com poucas informações sobre as características estruturais das substâncias húmicas, porém Kononova [159] viu que a relação obtida entre as absorbâncias em 465 e 665 nm (razão E_4/E_6) está relacionada com o grau de humificação, ou grau de evolução das substâncias húmicas. Uma razão E_4/E_6 baixa significa constituintes aromáticos mais humificadas, maior grau de condensação da amostra. Uma E_4/E_6 alta, significa estruturas alifáticas menos humificadas. [158] Há controvérsias no uso dessa técnica; ela não é interessante para comparação entre solos de composições diferentes, por exemplo.

4.1.3.3 Espectroscopia de Fluorescência

Fluorescência é a capacidade de uma substância emitir luz quando exposta à radiação, por exemplo, ultravioleta. As radiações absorvidas transformam-se em luz visível, ou seja, com um comprimento de onda maior que o da radiação incidente. [55]

A emissão de luz por uma substância é um fenômeno conhecido como luminescência. A fotoluminescência ocorre quando o material é excitado por radiação ultravioleta-visível e está ligado com os processos de absorção e dissipação de energia. [55]

O processo de luminescência de um material está relacionado com os processos de absorção/dissipação de energia. Numa molécula orgânica, essa energia absorvida produz mudanças na energia eletrônica, devido à transição de elétrons. Essa transição é decorrente da excitação eletrônica de um elétron de um orbital molecular ocupado para um orbital próximo, porém de energia mais alta. Caso essa energia não seja suficiente para ionizar/dissociar a molécula, ela permanece um tempo no estado excitado e emite energia na forma de calor ou luz. Essa luz emitida é chamada luminescência. [55]

Para a molécula retornar ao estado fundamental, ela pode perder energia por processos não radioativos. Essa emissão é chamada de fluorescência e terá uma energia menor que a energia de excitação da molécula. [55]

A técnica vem sendo muito usada para o estudo estrutural e funcional de ácidos húmicos, devido à alta sensibilidade relacionada aos grupos funcionais fluorescentes intrínsecas a ela e seus precursores, particularmente anéis aromáticos, fenóis, grupos quinona e cadeias insaturadas. [160]

Várias pesquisas tem mostrado o uso da espectroscopia de fluorescência para a avaliação da humificação das substâncias húmicas, apresentando vantagens sobre a ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE), já que é mais sensível, de menor custo relativo e mais simples. [161]

Duas técnicas foram usadas, baseadas no modo de emissão e de varredura sincronizada. A primeira obtém os espectros pela medição da intensidade da radiação emitida em função do comprimento de onda, mantendo fixo o comprimento de onda de excitação. Os espectros de emissão das substâncias húmicas são geralmente caracterizados por uma banda larga de absorção, com intensidade relativa e comprimento máximo de absorção, que varia numa faixa limitada para substâncias húmicas de mesma natureza e origem, mas altamente dependente do material húmico estudado. [158] Milori manteve o comprimento de onda de excitação em 465 nm e a área obtida pelo espectro foi chamada de índice A_{465} , proporcional ao grau de humificação. [161]

Já na segunda, os espectros são obtidos medindo a intensidade de fluorescência, quando a molécula é varrida por ambos os comprimentos de onda, mas mantendo uma diferença de $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$ entre eles. Esta técnica tem sido utilizada para estudar misturas de fluoróforos e, em alguns casos, espectros bem resolvidos puderam ser obtidos a partir de misturas para as quais, por espectrofluorimetria convencional, obtinham-se espectros com bandas sobrepostas. [158] Kalbitz obteve máximos de emissão em 399 e 465 nm, logo, o grau de humificação foi avaliado pela razão entre esses máximos (I_{465}/I_{399}). [162]. A Figura 59 mostra um esquema ilustrativo de um espectrômetro de fluorescência.

Figura 59 – Esquema representativo de um espectrômetro de fluorescência.

Fonte: SKOOG et al (2006). [55]

A adição de pesticidas pode provocar alterações nos espectros de emissão das substâncias húmicas, pois as interações entre eles podem mudar a região de emissão .

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo Geral

A adição de vermicomposto ao solo é uma forma de remediação muito eficiente e pouco invasiva, visto que a matéria orgânica tem grande influência na retenção de xenobióticos no solo e é sabido que os ácidos húmicos tem papel primordial nesse processo. Assim, o objetivo geral deste capítulo é saber de que modo os ácidos húmicos interagem com os poluentes orgânicos.

5.2.2 Objetivos Específicos

Verificar interações estruturais entre os ácidos húmicos e as moléculas de glifosato e deltametrina via técnicas de UV-Vis, fluorescência e FTIR.

5.3 Experimental

5.3.1 Materiais

5.3.1.1 Vidrarias

Balão volumétrico (250 mL);
Béquer plástico de 5 L;
Bagueta plástica;
Erlenmeyer (500 mL);
Funil de Buchner;
Kitasato (500 mL).

5.3.1.2 Reagentes

Água isenta de orgânicos;
Ácido sulfúrico PA;
Carvão ativo;
Fenolftaleína 0,01%;
KBr seco;
Nitrogênio líquido;
Peróxido de hidrogênio PA;
Solução de AgCl 0,01 mol L⁻¹;
Solução de CaAc₂ 0,5 mol L⁻¹;
Solução de HCl 0,1 mol L⁻¹;
Solução HCl 0,1 mol L⁻¹ + HF 0,3 mol L⁻¹;
Solução de HCl 0,5 mol L⁻¹;
Solução de HCl 6 mol L⁻¹;
Solução de KOH 0,1 mol L⁻¹;
Solução de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹.
Solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

4.3.1.3 Equipamentos

Balança analítica (BG 1000 Gehaka);
Liolifizador (Liotop L202);
Forno de micro-ondas (Berghof Speed Wave Four);
Centrífuga (Novatecnica NT810);
Espectrômetro de FTIR (Bomem MB-102);
Espectrômetro de Absorção UV (Vis Jasco V-630);
Espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi);
Espectrofotômetro UV-Vis HACH, modelo DR 6000;
Mesa agitadora (Tecnal TE-140).

4.3.1.4 Outros

Membrana de diálise (Spectra/Por 6000 – 8000 Da);
Papel de filtro;
Vasilha plástica de 5 L;
Suporte plástico para apoio de amostras em diálise.

5.3.2 Nomenclatura das amostras

Para as determinações envolvendo a caracterização de ácidos húmicos, foram usadas as amostras de solo dos testes de toxicidade (descrito no Capítulo III). As amostras de solo extraídas foram: três amostras para o experimento envolvendo glifosato: solo + 10000 mg kg⁻¹ GLY, solo + 10000 mg kg⁻¹ GLY + 3% VTF, e solo referência; e sete amostras para o experimento envolvendo deltametrina: solo + 500 mg kg⁻¹ DELTA, solo + 500 mg kg⁻¹ DELTA + 3% VTF, solo + 500 mg kg⁻¹ DELTA + 3% VBL, solo + 500 mg kg⁻¹ DISP, solo + 500 mg kg⁻¹ DISP + 3% VBL, solo + 500 mg kg⁻¹ DISP + 3% VTF e solo referência.

Para facilitar a compreensão dos resultados, essas amostras receberam nova nomenclatura, que está descrita na Tabela 53.

Tabela 53 – Nomenclatura original das amostras do teste de toxicidade e seu correspondente nome reduzido, utilizado para melhor interpretação dos resultados de caracterização dos ácidos húmicos.

Nomenclatura original	Nomenclatura reduzida
Solo referência	Referência
SOLO + 10000 mg kg⁻¹ GLY	Solo + GLY
SOLO + 10000 mg kg⁻¹ GLY + 3% VTF	Solo + GLY + VTF
SOLO + 500 mg kg⁻¹ DELTA	Solo + DELTA
SOLO + 500 mg kg⁻¹ DELTA + 3% VTF	Solo + DELTA + VTF
SOLO + 500 mg kg⁻¹ DELTA + 3% VBL	Solo + DELTA + VBL
SOLO + 500 mg kg⁻¹ DISP	Solo + DISP
SOLO + 500 mg kg⁻¹ DISP + 3%VBL	Solo + DISP + VBL
SOLO + 500 mg kg⁻¹ DISP + 3%VTF	Solo + DISP + VTF

GLY – glifosato

DELTA – deltametrina

DISP – dispersante

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

5.3.3 Nitrogênio Kjeldahl (NKT) e fósforo

A metodologia está descrita no Capítulo II, item 2.3.5.4.

5.3.4. Capacidade de troca catiônica

A metodologia está descrita no Capítulo III, item 4.3.2.4.

5.3.5 Caracterização dos ácidos húmicos

5.3.5.1 Fracionamento químico

As amostras de solo foram submetidas a um processo de extração e purificação por diferença de solubilidade, segundo a metodologia recomendada para solos pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas – IHSS. [163]

Partindo de 100,0 g de solo, inicialmente foi realizada uma extração com HCl 0,1 mol L⁻¹, em proporção de 1,0 g de solo seco: 10,0 mL de solução. Durante uma hora, a mistura permaneceu sob agitação mecânica. Em seguida foi deixada em repouso por 2 horas, para separar o sobrenadante do precipitado por decantação, sendo este sobrenadante o primeiro extrato de ácido fúlvico. Em seguida foi realizada uma extração com NaOH 0,1 mol L⁻¹, na mesma proporção anteriormente citada. A solução permaneceu sob agitação mecânica durante quatro horas. A solução foi mantida em repouso durante 16 horas, para separar o sobrenadante do resíduo por decantação. O precipitado era referente à fração mineral (humina), a qual foi descartada. O sobrenadante foi centrifugado, por 20 minutos a 10.000 rpm, para eliminação da argila. Em seguida, com um conta-gotas, o sobrenadante foi acidificado com HCl 6 mol L⁻¹ até pH 1-2 sob agitação constante e foi deixado em repouso por mais 12 horas, para decantação. O precipitado é referente à fração de ácido húmico e o sobrenadante é o extrato 2 do ácido fúlvico, que foi separado por sifonação. A partir desta etapa teve início a purificação dos ácidos húmicos, o precipitado foi redissolvido em solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ e foi adicionado KCl para completar uma concentração de íons K⁺ equivalente a 0,3 mol L⁻¹. A solução foi centrifugada para a eliminação dos sólidos suspensos (impurezas) sob alta velocidade (15.000 rpm – 20 min) para que os sólidos suspensos fossem removidos. O AH foi então reprecipitado, adicionando-se HCl 6,0 mol L⁻¹ com agitação simultânea até que fosse atingido pH 1-2 e, após, a suspensão foi mantida em repouso por 16 horas. Centrifugou-se a solução (10.000 rpm – 10 min), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado (AH) foi suspenso em solução HCl 0,1 mol L⁻¹ + HF 0,3 mol L⁻¹ em um recipiente plástico e agitado durante 16 horas a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada (12.000 rpm – 20 min) e o precipitado foi transferido para uma

membrana de diálise (Spectra/Por 6000 – 8000 Da), preparada segundo a metodologia de Mc Phie [164], utilizando água deionizada. Procedeu-se à diálise até que a água de diálise apresentasse teste negativo de Cl^- com nitrato de prata. Para isso, tal procedimento foi mantido durante aproximadamente sete dias, fazendo-se a troca da água deionizada diariamente. Após a diálise, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Após a liofilização os AH foram macerados e armazenados para futuras caracterizações.

4.3.5.2 Análises espectroscópicas

4.3.5.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR)

As determinações por FTIR foram feitas com base na metodologia sugerida por Stevenson, (1994). [154] As pastilhas foram preparadas na proporção de 1 mg de amostra de ácido húmico para cada 100 mg de KBr (seco em estufa a 105°C). As pastilhas foram prensadas por 2 minutos com uma carga equivalente a aproximadamente 10 toneladas. Os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras no intervalo de 4.000 a 400 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} . O equipamento utilizado foi o espectrômetro de FTIR da Bomem, modelo MB-102.

4.3.5.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível (UV-Vis)

Foram obtidos espectros de absorção na região de 800 a 400 nm e na região de 400 a 200 a partir da solução de 200 mg L^{-1} de AH em NaHCO_3 $0,05\text{ mol L}^{-1}$. A varredura do espectro foi feita com passo de 0,1 nm. Utilizou-se um Espectrômetro de Absorção UV – Vis Jasco, modelo V-630.

4.3.5.2.3 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos a partir de soluções de 10 mg kg⁻¹ de ácido húmico. As soluções foram preparadas a partir da solução de 2 mg de AH em 10 mL de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹, ajustadas para pH 8. Os espectros foram adquiridos pelos modos de emissão e excitação, segundo propostas de Milori e Kalbitz. [161], [162]

Os espectros de emissão segundo Milori foram obtidos com excitação de 465 nm, com intervalo de varredura entre 480 – 700 nm. A determinação do índice de humificação foi baseada na área do espectro de emissão (A_{465}). Os espectros de varredura sincronizada, segundo a metodologia de Kalbitz, foram obtidos entre 300 – 520 nm, simultaneamente com excitação e emissão, com diferença de comprimento de onda $\Delta\lambda = 55$ nm. A determinação do índice de humificação foi realizada a partir da razão entre as intensidades de fluorescência entre 470 e 360 nm.

O equipamento utilizado para obtenção dos espectros foi o Espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi).

5.3.6 Estatística

Todas as análises para a caracterização do solo foram realizadas em quintuplicata e o erro foi calculado de acordo com o teste T de Student em um intervalo de confiança de 95%.

5.4 Resultados e discussões

5.4.1 Nitrogênio Kjeldahl e Fósforo

A Tabela 54 mostra os valores obtidos para os teores de nitrogênio Kjeldahl e fósforo do solo e amostras (na presença de glifosato ou deltametrina).

A medição dos teores de nitrogênio e fósforo é importante, pois são dois dos principais atributos da fertilidade do solo. O primeiro é fator determinante para a produtividade, pois está diretamente ligado ao crescimento das culturas e o segundo é o elemento mais limitante para o desenvolvimento de plantas, já que os solos nacionais são muito carentes dele. [165], [166]

Tabela 54 - Teor de nitrogênio total Kjeldahl e fósforo total no solo e após a realização dos testes de toxicidade.

Amostras	Nitrogênio total Kjeldahl (mg kg⁻¹)	Fósforo total (mg kg⁻¹)
Solo natural	1.968,50 ± 98,42	972,27 ± 48,61
Solo referência (GLY)	2.422,48 ± 121,12	984,53 ± 49,22
Solo + GLY	2.000,00 ± 101,00	764,00 ± 38,20
Solo + GLY + VTF	2.034,88 ± 101,75	1.131,57 ± 56,58
Solo referência (DELTA/DISP)	4.133,06 ± 206,65	776,23 ± 38,81
Solo + DISP	2.008,03 ± 100,40	714,97 ± 35,75
Solo + DISP + VTF	1.900,00 ± 95,00	641,4 ± 32,05
Solo + DISP + VBL	2.689,24 ± 134,46	714,97 ± 35,29
Solo + DELTA	1.394,42 ± 69,72	739,47 ± 36,97
Solo + DELTA + VTF	1.666,67 ± 83,33	1339,94 ± 67,00
Solo + DELTA + VBL	500,00 ± 25,01	322,8 ± 16,14

GLY – glifosato

DELTA – deltametrina

DISP – dispersante

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Vale ressaltar que como os experimentos de toxicidade de glifosato e deltametrina foram conduzidos em épocas distintas, foi necessário o monitoramento de duas amostras de solo referência (uma para cada xenobiótico). Denomina-se solo referência o solo com as minhocas, isto é, sem adição de xenobióticos, apenas com as minhocas.

De maneira geral, os valores de nitrogênio e fósforo foram alterados (em relação à amostra referência) da seguinte forma: em relação aos experimentos envolvendo glifosato, houve uma diminuição desses teores ao se adicionar o herbicida (na ausência de vermicomposto), o que leva a entender que houve, em um primeiro momento, um consumo destas moléculas por parte das minhocas, mas devido ao caráter tóxico do herbicida, houve prejuízo no desenvolvimento das mesmas. Nas amostras em que vermicomposto foi adicionado, o aumento dos teores de nitrogênio e fósforo pode ser explicado pela simples adição de matéria orgânica no sistema.

Para os experimentos envolvendo deltametrina, em linhas gerais, os teores de nitrogênio e fósforo seguiram a mesma tendência. É importante destacar que nas amostras em que se adicionou deltametrina, a queda no teor de nitrogênio foi muito mais acentuada. Já os teores de fósforo foram pouco alterados.

5.4.2 Capacidade de troca catiônica

A Tabela 55 mostra o valor obtido para a capacidade de troca catiônica do solo e amostras (na presença de glifosato ou deltametrina). A capacidade de troca iônica dos solos representa a graduação da capacidade de liberação de vários nutrientes, favorecendo a manutenção da fertilidade por um prolongado período e reduzindo ou evitando a ocorrência de efeitos tóxicos da aplicação de fertilizantes [167].

Tabela 55 - Capacidade de troca catiônica em amostras de solo após a realização dos testes de toxicidade.

Capacidade de troca catiônica	mmol_c kg⁻¹
Solo natural	217,00 ± 7,72
Solo referência (GLY)	72,32 ± 3,94
Solo + GLY	99,75 ± 4,55
Solo + GLY + VTF	112,67 ± 5,58
Solo referência (DELTA/DISP)	120,37 ± 6,59
Solo + DISP	93,47 ± 4,94
Solo + DISP + VTF	104,69 ± 5,27
Solo + DISP + VBL	107,81 ± 5,56
Solo + DELTA	105,76 ± 5,29
Solo + DELTA + VTF	125,41 ± 6,42
Solo + DELTA + VBL	93,54 ± 4,43

GLY – glifosato

DELTA – deltametrina

DISP – dispersante

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Araújo e colaboradores (2003) [168] determinaram a CTC em dois tipos de solo distintos (latossolo vermelho e argissolo vermelho amarelo) e chegaram a valores entre 88 e 112 mmol_c kg⁻¹. Assim, pode-se constatar que o solo apresenta uma CTC elevada, ou seja, favorece a manutenção da fertilidade.

5.4.3 Caracterização dos ácidos húmicos

5.4.3.1 Teor de carbono

A Tabela 56 mostra o valor obtido para o teor de carbono para os ácidos húmicos extraídos das amostras de solo utilizado nos testes de toxicidade de glifosato e deltametrina.

Tabela 56 - Teor de carbono total dos ácidos húmicos das amostras dos testes de toxicidade

Carbono total	%
Solo referência (GLY)	2,82 ± 0,47
Solo + GLY	3,38 ± 0,63
Solo + GLY + VTF	3,99 ± 0,35
Solo referência (DELTA/DISP)	3,08 ± 0,14
Solo + DISP	3,34 ± 0,36
Solo + DISP + VTF	3,75 ± 0,16
Solo + DISP + VBL	4,07 ± 0,61
Solo + DELTA	4,88 ± 0,27
Solo + DELTA + VTF	4,33 ± 0,21
Solo + DELTA + VBL	4,36 ± 0,58

GLY – glifosato

DELTA – deltametrina

DISP – dispersante

VTF – vermicomposto de torta de filtro

VBL – vermicomposto de bagaço de laranja

Fonte: autoria própria

Pelos resultados apresentados na tabela, o teor de carbono presente nos ácidos húmicos não teve grandes alterações. As amostras do experimento envolvendo glifosato mantiveram praticamente o mesmo teor. Nas amostras envolvendo deltametrina houve acréscimo no teor de carbono, devido à adição de deltametrina (um piretróide com muitos átomos de carbono) e vermicomposto ao solo.

5.4.4 Análises espectroscópicas

A vermicompostagem é o processo de mineralização da matéria orgânica executada por minhocas, e durante esse processo, há a liberação de diversos nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, dentre outros) para as plantas. O húmus produzido na vermicompostagem também possui um alto teor de material coloidal, melhorando assim a qualidade do solo. Sendo assim, é importante fazer análises espectroscópicas a fim de se avaliar quimicamente as mudanças ocorridas durante esse processo. [110]

É sabido que as substâncias húmicas presentes na matéria orgânica são capazes de adsorver pesticidas, devido à presença de grupos funcionais distintos (carboxilas, hidroxilas fenólicas, carbonilas etc), logo, outra etapa do trabalho foi adicionar vermicomposto às amostras contendo os xenobióticos a

fim de verificar uma possível complexação do glifosato com o ácido húmico presente no húmus.

5.4.4.1 Espectroscopia no FTIR

5.4.4.1.1 Glifosato

Pode-se observar na Figura 60 que os espectros de FTIR para os três ácidos húmicos extraídos, provenientes do solo referência, do solo + glifosato e do solo + glifosato + vermicomposto, apresentam o mesmo perfil. As bandas foram atribuídas segundo Stevenson, (1994), Silverstein e colaboradores (2008), Amalfitano e colaboradores (2002), Fialho e colaboradores (2010), Castaldi e colaboradores (2005) e Mangrich e colaboradores (2000) e são características de substâncias húmicas de solos. [154], [169]–[172]

Figura 60 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos extraídos de solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato. Observa-se a presença das principais bandas referentes aos ácidos húmicos. Maiores detalhes no texto.

Fonte: autoria própria

As bandas em 3525 e 3444 são características de estiramentos de grupos fenólicos. As bandas em 2930-2850 cm^{-1} se referem a estiramentos C-H de estruturas alifáticas (assimétrica e simétrica, respectivamente). Na região de 1720 cm^{-1} observa-se a banda correspondente a estiramentos de grupos carbonílicos (C=O) não conjugados e em 1625 cm^{-1} a banda correspondente à amidas primárias, C-O conjugado e C=C em estruturas aromáticas.

As bandas na região de 1450 cm^{-1} se referem a estiramentos C-H de grupos CH_3 e CH_2 . Em 1265 cm^{-1} a estiramentos C-O de grupos fenóis e a região em 1090-1040 cm^{-1} de estiramentos de polissacarídeos.

Em 1089 cm^{-1} tem uma banda correspondente ao estiramento Si-O-Si (quartzo) e em 1033 cm^{-1} uma banda correspondente ao estiramento C-O de polissacarídeos. Para todas as bandas citadas acima se pode observar um incremento na intensidade das mesmas na ordem: referência < solo + GLY < solo + GLY + VTF.

Os espectros de FTIR são capazes de fornecer informações que identificam possíveis alterações na estrutura da matéria orgânica. A relação entre as absorvâncias em 2.927 e em 1.050 cm^{-1} (relação entre grupos apolares e polares) fornece o índice de hidrofobicidade (quanto maior esse índice, maior resistência à degradação microbiana). [173] Essa relação não pode ser usada pois nota-se no espectro a presença de muito material inorgânico, o que mascararia o índice e uma falsa interpretação seria dada.

Colnago e colaboradores (1997, 1998), Huang e colaboradores (2011) e Guerra-López e colaboradores (2010) [174]–[177] recomendam que, para melhor interpretação dos espectros de FTIR, é interessante calcular a segunda derivada, a fim de melhorar a resolução do espectro e facilitar a visualização de bandas que possam ter ficado escondidas. Sendo assim, a Figura 61 mostra os espectros de FTIR (segunda derivada) dos ácidos húmicos dos experimentos de toxicidade envolvendo a formulação comercial de glifosato.

Figura 61 – Espectros de FTIR derivados dos ácidos húmicos extraídos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato (referência, solo + GLY e solo + GLY + VTF). Nota-se com maior nitidez as bandas envolvendo as interações entre glifosato e ácidos húmicos.

Fonte: autoria própria

Apesar da presença de material inorgânico na amostra, com esta nova forma de apresentação, pode-se perceber que quando se comparam as amostras de ácido húmico dos três solos, há um aumento significativo do número de bandas na região entre 800 e 1070 cm^{-1} . Esta região apresenta as vibrações características do glifosato, tais como em 916 cm^{-1} , características de deformações CH_2 , 980 cm^{-1} , características de vibrações CH_2 , 1000 cm^{-1} , características de vibrações P-OH , 1031 e 1081 cm^{-1} , características de vibrações da cadeia C-C-N-C , 1094 cm^{-1} , características de vibrações P-O^- , 1168 cm^{-1} , também características de vibrações P-OH . Os resultados obtidos por Miano [178] também apresentam características semelhantes.

Por sua vez, quando se comparam as amostras de solo + GLY e solo + GLY + VTF, há um aumento na intensidade da banda em 667 cm^{-1} , que é característica de vibrações de alquenos-*cis*. A região entre 1562 e 1651 cm^{-1} , característica de deformações axiais em sistemas cíclicos, em anéis de sete átomos, tem sua intensidade aumentada significativamente. [155] Todas essas bandas são características de ácidos húmicos.

Baseado nisso, é possível propor mecanismos de adsorção do glifosato pelos ácidos húmicos, visto que as bandas de glifosato no ácido húmico são bem evidentes. Conforme a Figura 62, as principais formas de adsorção são via ligação iônica e ligação de hidrogênio.

Figura 62 – Esquema de propostas de mecanismos de adsorção do glifosato pelos ácidos húmicos.

Fonte: autoria própria

Albers e colaboradores (2009) afirma que um possível mecanismo de ligação seja através de ligações hidrogênio do glifosato a grupos fenólicos das substâncias húmicas. A adsorção do glifosato mostra que em solos arenosos, principalmente, a matéria orgânica, incluindo as substâncias húmicas, podem ser responsáveis por parte da sorção do herbicida. [98]

5.4.4.1.2 Deltametrina

Na Figura 63 encontram-se os espectros de FTIR para os ácidos húmicos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo deltametrina.

Figura 63 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos envolvendo o piretróide deltametrina (Referência, solo + DISP, solo + DISP + VTF, solo + DISP + VBL) – A e (solo + DELTA, solo + DELTA + VTF, solo + DELTA + VBL) – B. Observa-se a presença das principais bandas referentes aos ácidos húmicos.

Fonte: autoria própria

Nesta figura é possível observar que ambos os espectros apresentam uma banda entre 3400-3300 cm^{-1} , que corresponde a bandas de estiramento O-H de grupos fenólicos. As bandas em 2930-2850 cm^{-1} se referem a estiramentos C-H de estruturas alifáticas (assimétrica e simétrica, respectivamente).

Na região de 1720 cm^{-1} observa-se a banda correspondente a estiramentos de grupos carbonílicos (C=O) não conjugados e em 1625 cm^{-1} a banda correspondente ao estiramento assimétrico C-O dos íons carboxilato (COO^-), estiramento C=C em anéis aromáticos, estiramento C=O e ainda deformação N-H de amidas primárias. As bandas na região de 1450 cm^{-1} se referem a estiramentos C-H de grupos CH_3 e CH_2 , provenientes de deformação angular. Em 1265 cm^{-1} há uma banda referente a C-O de éteres, ácidos carboxílicos, grupos fenólicos e deformações N-H aromáticos e alifáticos e a região em 1090-1040 cm^{-1} de estiramentos de polissacarídeos. Há também as bandas em 912 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento O-H (deformação angular fora do plano, de carbonilas), em 802 cm^{-1} , de deformações fora do plano de grupos $\text{RCH}_2=\text{CHR}$, e em 744 cm^{-1} (anel aromático). A presença de

material inorgânico inviabilizou o cálculo dos índices de hidrofobicidade e aromaticidade.

A Figura 64 mostra os espectros de FTIR (segunda derivada) dos ácidos húmicos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo a formulação comercial de deltametrina.

Figura 64 - Espectros de FTIR derivados dos ácidos húmicos extraídos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (referência, solo + DISP, solo + DISP + VTF, solo + DISP + VBL) – A e solo + DELTA, solo + DELTA + VTF e solo + DELTA + VBL) – B.

Para ambos os tratamentos (com e sem princípio ativo), é possível perceber a diminuição da intensidade das bandas entre $3700\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, correspondente aos estiramentos de anéis aromáticos monossustituídos quando se adiciona os vermicompostos de torta de filtro ou bagaço de laranja. O aumento da banda em 2350 cm^{-1} se refere aos estiramentos $\text{C}=\text{O}$ do gás carbônico ou compostos de silício. A região entre $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ também teve diminuição pronunciada com a adição dos vermicomposto, que é a região correspondente aos estiramentos $\text{C}=\text{N}$ de amidas, $\text{C}=\text{C}$ de anéis aromáticos, deformações N-H e C-H de estruturas alifáticas e quinonas conjugadas. Houve também um aumento da intensidade das bandas na região de $1200\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, correspondentes aos estiramentos C-O de grupos fenólicos, de polissacarídeos ou derivados e de vibrações C-H fora do plano. As bandas em 918 cm^{-1} correspondem à estruturas vinílicas, 912 cm^{-1} às deformações O-H fora do plano, 802 cm^{-1} à deformação fora do plano de $\text{RCH}_2=\text{CHR}$.

Devido ao tamanho da molécula e à presença de poucas bandas características da deltametrina no FTIR, é possível propor mecanismos de adsorção da deltametrina pelos ácidos húmicos. Conforme a Figura 65, a principal forma de adsorção proposta é via interações do tipo Van der Waals.

Figura 65 - Proposta de mecanismos de adsorção da deltametrina pelos ácidos húmicos.

Fonte: autoria própria

5.4.4.2 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível (UV-Vis)

5.4.4.2.1 Glifosato

A Figura 66 mostra o espectro de absorção do UV-Vis para as amostras de ácido húmico do solo dos testes de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato.

Figura 66 - Espectros de absorção na região do visível para os ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato ($[AH] = 20 \text{ mg L}^{-1}$ em $\text{NaHCO}_3 \text{ } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$).

Fonte: autoria própria

Pela figura, pode-se perceber que houve um decréscimo da absorbância conforme o aumento do comprimento de onda. A adição de glifosato ao solo provoca uma diminuição da absorção na região do visível. A adição de vermicomposto diminui ainda mais essa absorção.

Calculou-se o grau de humificação dos ácidos húmicos por meio da razão E_4/E_6 , que trata da relação entre as absorbâncias em 465 e 665 nm. Esta razão é bastante usada para caracterização de substâncias húmicas, pois indica o grau de condensação dos anéis aromáticos e, portanto, o grau de humificação (Tabela 57).

Tabela 57 – Valores de razão E_4/E_6 para os ácidos húmicos extraídos das amostras de solo dos testes de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato, por espectroscopia no visível.

Amostra	E_4/E_6
Referência	$8,71 \pm 0,44$
Solo + GLY	$5,24 \pm 0,26$
Solo + GLY + VTF	$2,86 \pm 0,14$

Fonte: autoria própria

De acordo com Stevenson (1994), a razão E_4/E_6 decresce com o aumento da massa molecular e da condensação dos anéis, e esse comportamento é observado com a adição de glifosato e vermicomposto. Neste caso, não se pode afirmar que a humificação de uma amostra de solo é maior que a outra devido à ação de microrganismos, pois o período de duração do experimento de toxicidade (dois meses) é muito pequeno para se verificar mudanças significativas na estrutura dos ácidos húmicos. Logo, o que provocou a diminuição do grau de humificação foi primeiro, a adição de glifosato ao solo e depois, a adição de vermicomposto, que naturalmente acrescenta anéis condensados à matéria orgânica.

5.4.4.2.2 Deltametrina

Na Figura 67, tem-se o espectro de absorção do UV-Vis para as amostras de ácido húmico das amostras de solo dos testes de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina.

Figura 67 – Espectros de absorção na região do visível para os ácidos húmicos extraídos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (sem princípio ativo – A e com princípio ativo – B).([AH] = 20 mg L⁻¹ em NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹).

Fonte: autoria própria

Para os experimentos envolvendo a formulação dispersante (sem a deltametrina como princípio ativo), pode-se perceber que houve um decréscimo conforme o aumento do comprimento de onda. Nos experimentos envolvendo a formulação completa, esse comportamento também ocorre, mas é possível perceber que a intensidade de absorção é maior. Uma possível explicação para esse fenômeno é que a molécula de deltametrina apresenta anéis benzênicos e átomos de bromo, que possuem elétrons livres em sua constituição e isso contribui para uma maior absorção de energia na região do ultravioleta/visível. A Tabela 58 apresenta o grau de humificação de todas as amostras, obtidas por espectroscopia no visível.

Tabela 58 – Valores de razão E_4/E_6 para os ácidos húmicos extraídos das amostras de solo dos testes de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina, por espectroscopia no visível.

Amostra	Grau de humificação (E_4/E_6)
Solo referência	5,24 ± 0,26
Solo + DISP	4,82 ± 0,24
Solo + DISP + VTF	4,77 ± 0,24
Solo + DISP + VBL	4,64 ± 0,21
Solo + DELTA	4,61 ± 0,21
Solo + DELTA + VTF	4,45 ± 0,22
Solo + DELTA + VBL	4,73 ± 0,24

Fonte: autoria própria

Ao se avaliar a razão E_4/E_6 , a única amostra que difere significativamente das demais é a amostra referência. As outras apresentam índices estatisticamente iguais o que dificulta o estabelecimento de possíveis relações estruturais entre os ácidos húmicos e a molécula de deltametrina/dispersante.

5.4.4.3 Fluorescência

A fluorescência é uma técnica de alta sensibilidade e é reconhecida para o estudo estrutural dos ácidos húmicos. Pelas metodologias de Kalbitz (1999) e Milori (2002) obtiveram-se informações a respeito da humificação das amostras.

5.4.4.3.1 Glifosato

Os espectros por varredura sincronizada (Kalbitz, 1999), medida com diferença constante entre excitação e emissão ($\Delta\lambda = 55$ nm) apresentaram duas bandas, uma em torno de 399 nm e outra em 470 nm. [162] O deslocamento do máximo de intensidade (de menores para maiores comprimentos de onda) está associado com o aumento no número de núcleos aromáticos substituídos com um sistema conjugado insaturado capaz de exibir alta ressonância. Logo, a intensidade de fluorescência pode ser usada para medir o grau de humificação. Neste estudo, foi possível determinar o índice

I_{377}/I_{470} . Os espectros obtidos estão na Figura 68. Os índices estão na Figura 69.

Figura 68 – Espectros de varredura sincronizada obtidos de acordo com a metodologia sugerida por Kalbitz de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato..

Fonte: autoria própria

Figura 69 – Grau de humificação I_{377}/I_{470} obtido segundo a metodologia por Kalbitz (2000) de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato.

Fonte: autoria própria

Os espectros obtidos segundo Milori e colaboradores (2002), apresentaram-se como única banda com um máximo de emissão em 514 nm para todos os tratamentos. [161] Observou-se um mesmo perfil para todos os tratamentos analisados (Figura 70). Segundo a metodologia, a área total do espectro resultante da luz de excitação azul é proporcional ao grau de humificação A_{465} (Figura 71).

Figura 70 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 465$ nm) de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato, de acordo com a metodologia sugerida por Milori.

Fonte: autoria própria

Figura 71 – Grau de humificação A_{465} obtido segundo a metodologia de Milori (2002) de ácidos húmicos extraídos dos solos dos testes de toxicidade envolvendo o herbicida glifosato. * = diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação à referência, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Analizando as duas técnicas de fluorescência para a determinação do grau de humificação das amostras, é possível notar que, pela metodologia de Kalbitz não se pode chegar a nenhuma conclusão, visto que nenhuma das amostras difere significativamente das demais. Pela metodologia de Milori, a amostra de solo com presença do herbicida glifosato difere significativamente da referência e a que apresenta vermicomposto tem grau de humificação semelhante ao solo referência. O que pode ter acontecido é que, pela adição de vermicomposto, o glifosato foi retido pela matéria orgânica, mascarando sua presença pela técnica de fluorescência. Fora isso, tampouco é possível estabelecer relações muito precisas sobre a interação dos ácidos húmicos com o glifosato.

5.4.4.3.2 Deltametrina

Da mesma forma que nos experimentos envolvendo glifosato, os espectros por varredura sincronizada (Kalbitz, 1999) apresentaram duas bandas, uma em torno de 399 nm e outra em 470 nm. [162] Nesse estudo, também se determinou o índice I_{377}/I_{470} . Os espectros obtidos estão na Figura 72. Os índices estão na Figura 73.

Figura 72 – Espectros de varredura sincronizada obtidos de acordo com a metodologia sugerida por Kalbitz de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (sem princípio ativo – A e com princípio ativo – B).

Fonte: autoria própria

Figura 73 – Grau de humificação de ácidos húmicos extraídos dos solos dos testes de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina, pela metodologia sugerida por Kalbitz. * = diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação à referência, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Da mesma forma que os experimentos envolvendo glifosato, os espectros obtidos segundo Milori e colaboradores (2002) para os experimentos envolvendo deltametrina, apresentaram como única banda um máximo de emissão em 514 nm para todos os tratamentos. [161] Observou-se um mesmo perfil para todos os tratamentos analisados (Figura 74). Segundo a metodologia, a área total do espectro resultante da luz de excitação azul é proporcional ao grau de humificação A_{465} (Figura 75).

Figura 74 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 465$ nm) obtidos de acordo com a metodologia sugerida por Milori de ácidos húmicos extraídos dos solos dos experimentos de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina (sem princípio ativo – A e com princípio ativo – B).

Fonte: autoria própria

Figura 75 - Grau de humificação de ácidos húmicos extraídos dos solos dos testes de toxicidade envolvendo o piretróide deltametrina, pela metodologia sugerida por Milori. * = diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação à referência, de acordo com o teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

Fonte: autoria própria

Os experimentos envolvendo o piretróide deltametrina (formulação completa) apresentam maiores absorções do que os experimentos envolvendo apenas a formulação dispersante. Isso indica que os dispersantes não apresentam agentes fluoróforos, já que a presença de anéis aromáticos da deltametrina contribuem para o aumento do índice de fluorescência da amostra.

5.5 Conclusões

Glifosato e deltametrina interagem com os ácidos húmicos presentes na matéria orgânica do solo, de acordo com as evidências apresentadas pelas espectroscopias de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), ultravioleta-visível e fluorescência.

Os resultados exibidos neste capítulo mostram que, no que se refere ao grau de humificação, não se pode chegar a evidências conclusivas. No entanto, o foco do estudo não foi a avaliação deste em relação ao tempo, e sim propor formas de interação entre estes xenobióticos com os ácidos húmicos.

Pelo estudo em FTIR, apesar da presença de material inorgânico, foi possível perceber a interação dos ácidos húmicos com o glifosato e com a deltametrina, afinal, se os xenobióticos provocam efeito deletério às minhocas e a adição de matéria orgânica melhora seu desenvolvimento, a técnica mostrou que os xenobióticos ficaram retidos nos ácidos húmicos.

Conhecer os modos de ligação dos xenobióticos às estruturas húmicas é importante para que se possa prever possíveis efeitos de contaminação de solos em longo prazo e estudar formas eficazes de remediação destes.

Referências Bibliográficas

- [1] FELIPPES, B. A.; AGUIAR, J. G.; DINIZ, A. C. G. Sistema da qualidade em laboratórios universitários: incentivo ao ensino, pesquisa e extensão. **Revista de Ensino de Engenharia**, v. 30, n. 2, p. 14–23, 2005.
- [2] OLIVARES, I. R. B. **Gestão de qualidade em laboratórios**. Campinas: Átomo, 2009. 160 p.
- [3] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **About us**. 2015. Disponível em: <<http://www.iso.org/iso/home.html>>. Acesso em: 01 dez. 2014
- [4] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Institucional**. 2015. Disponível em: <<http://www.abnt.org.br/>>. Acesso em: 19 mar. 2014.
- [5] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Institucional**. 2015. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/>>. Acesso em: 17 jun 2015.
- [6] VALLE, B.; BICHO, G. G. ISO/IEC 17025: A nova norma para laboratórios de ensaio e calibração. **Revista Metrologia Instrumentação - Laboratórios & Controle de Processos**, v. 1, n. 5, p. 2, 2001.
- [7] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**, Rio de Janeiro, 2005. 37 p.
- [8] OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the analytical quality assurance cycle. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 109–121, 2012.
- [9] GROCHAU, I. H.; TEN CATEN, C. S. A process approach to ISO/IEC 17025 in the implementation of a quality management system in testing laboratories. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 17, p. 519–527, 2012.
- [10] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Pesquisa sobre ISO revela interesse do usuário**. 2005. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/naMedida.asp>>. Acesso em 18 jun 2015.
- [11] VLACHOS, N. A.; MICHAIL, C.; SOTIROPOULOU, D. I ISO/IEC 17025 accreditation a benefit or hindrance to testing laboratories? The greek experience. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 749–757, 2002.

- [12] MOURA, N. M. S.; COSTA, I. S.; SALLES, D. M. R. Impactos da implantação de um sistema de gestão da qualidade baseado em norma ISO na cultura de laboratório no Instituto Nacional de Tecnologia - INT. **Sustainable Business International Journal**, n. 14, p. 1–18, 2012.
- [13] KAML, C.; WEISS, C.C.; DEZENDORF, P.; ISHIDA, M.; RICE, D.H.; KLEIN, R.; SALFINGER, Y. Developing a Competency Framework for U.S. state food and feed testing laboratory personnel. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 2, p. 768–772, 2014.
- [14] NOGUEIRA, R.; SOARES, M. A. Accreditation and recognition programs in Brazil: Current situation and perspectives. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 18, p. 217–223, 2013.
- [15] RICCI, U. Establishment of an ISO 17025:2005 accredited forensic genetics laboratory in Italy. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 19, p. 289–299, 2014.
- [16] HALEVY, A. The benefits calibration and testing laboratories may gain from ISO/IEC 17025 accreditation. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 8, p. 286–290, 2003.
- [17] LOPES, I.; SANTOS, L.; PEREIRA, M.F.; VAZ, P.; ALVES, J.G.. Implementation of the quality management system at the Laboratory of Radiological Protection and Safety (LPSR) in Portugal. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 19, p. 355–360, 2014.
- [18] TANABE, C. H.; SOUZA, J. P. DE. Dificuldades na implantação de um sistema da qualidade baseado na norma ISO 9001: 2000: estudos de casos de empresas do setor metal-mecânico da região de Maringá/PR. In: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 13., 2006, Bauru. **Anais XIII Simpósio de Engenharia de Produção (SIMPEP)**. Bauru: Universidade Estadual Paulista, 2006. p. 230-234.
- [19] KOMATSU, E.; VAZ, M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 720–724, 2004.
- [20] BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, p. 10–15, 2012.
- [21] BARRETT, K.; JAWARD, F. M. A review of endosulfan, dichlorvos, diazinon, and diuron – pesticides used in Jamaica. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 22, p. 481–499, 2012.
- [22] SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy**, v. 37, n. 6, p. 616–626, dez. 2012.

- [23] ARAÚJO, A. J.; LIMA, J.S.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.D.C.; SOARES, M.D.O.; MONTEIRO, M.C.M.; AMARAL, A.M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C.A.N.; NEVES, C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 115–130, 2007.
- [24] KATSUDA, Y. Progress and future of pyrethroids. In: MATSUO, N.; MORI, T. (Ed.). **Pyrethroids**. Berlin: Springer, 2012. p. 30.
- [25] FARGHALY, M. F. M.; ZAYED, S. M. A D.; SOLIMAN, S. M. Deltamethrin degradation and effects on soil microbial activity. **Journal of Environmental Science and Health, Part. B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, n. 7, p. 575–81, 2013.
- [26] SODERLUND, D. M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 165–181, 2012.
- [27] EUROPEAN COMMISSION. HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Deltamethrin**. 2012 Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/pro/eva/existing/list1-31_en.pdf. Acesso em: 29 maio 2012.
- [28] ROTUNDO, Maurício. **Exposição dérmica de trabalhadores a resíduos de deltametrina presentes nas plantas, na reentrada na lavoura de algodão após pulverização**. 2007. 132 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2007.
- [29] SANTOS, M.A.T.; RODRIGUES, M.V.N.; ÁREAS, M.A.; REYES, F.G. Deltamethrin and permethrin in the liver and heart of wistar rats submitted to oral subchronic exposure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 891–896, 2011.
- [30] VELKI, M.; HACKENBERGER, B. K. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1216–26, jan. 2013.
- [31] KUMAR, A.; SASMAL, D.; SHARMA, N.; BHASKAR, A.; CHANDRA, S.; MUKHOPADHYAY, K.; KUMAR, M. Deltamethrin, a pyrethroid insecticide, could be a promising candidate as an anticancer agent. **Medical Hypotheses**, v. 85, n. 2, p. 145–147, 2015.
- [32] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2013. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 8 fev 2013.

- [33] ABREU, A. B. G.; MATTA, M. H. R.; MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5–9, 2008.
- [34] AMELIN, V. G.; BOL'SHAKOV, D. S.; TRETIAKOV, A. V. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface water and vegetable oil by capillary zone electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 386–391, 2012.
- [35] KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P. P. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chl. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 1-2, p. 111–7, 2005.
- [36] GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Glifosato - Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: ACADCOM, 2005. 66 p.
- [37] REDDY, K. N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.; NANDULA, V.K. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2125–30, 2008.
- [38] ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRANAGA, M.R.; MARTÍNEZ, M.A.; CASTELLANO, V.J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M.T.; NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 1, p. 91–5, 8 out. 2009.
- [39] HALE, S. E.; HANLEY, K.; LEHMANN, J.; ZIMMERMAN, A.; CORNELISSEN, G. The effects of chemical, biological, and physical aging as well as soil addition on the sorption of pyrene to activated carbon and biochar. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 24, p. 10445–53, 2011.
- [40] PRIESTMAN, M.A.; HEALY, M.L.; FUNKE, T.; BECKER, A.; SCHONBRUNN, E. Molecular basis for the glyphosate-insensitivity of the reaction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with shikimate. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5773–5780, 2005.
- [41] TONI, L.R.M.; SANTANA, H.S.; ZAIA, A.M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829–833, 2006.
- [42] SOUZA, T.A.; MATTA, M.H.R.; MONTAGNER, E.; ABREU, A.B.G. Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1372–1376, 2006.
- [43] EUROPEAN COMMISSION. HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Glyphosate**. 2012. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/ph_ps/pro/eva/existing/list1_glyphosate_en.pdf Acesso em: 29 maio 2012.

- [44] DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 545–50, 1995.
- [45] AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- [46] ARAÚJO, Ademir Sérgio Ferreira de. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- [47] THIER, H.-P.; KIRCHHOFF, J. (Ed.). **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Wiley, 1987. 433 p.
- [48] BOTTA, F.; LAVISON, G.; COUTURIER, G.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; FAUCHON, N.; GUERY, B.; CHEVREUIL, M.; BLANCHOU, H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. **Chemosphere**, v. 77, n. 1, p. 133–9, 2009.
- [49] COTTA, J.A.O.; REZENDE, M.O.O.; LANDGRAF, M.D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2026–2033, 2009.
- [50] FERREIRA, B.L.; CHAVES, E.S.; VIALICH, J.; SAUER, E. Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 3, p. 236–242, 2014.
- [51] MORAIS, E.H.C.; BEGNINI, F.R.; JARDIM, I.C.S.F. Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo. **Scientia Chromatografica**, v. 5, n. 2, p. 146–162, 2013.
- [52] HARRIS, D. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.
- [53] SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd. ed. New York: Wiley, 2011. 579 p.
- [54] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da Universidade de Campinas, 1987. 298 p.
- [55] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. São Paulo: Bookman, 2006. 836 p.
- [56] LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240 p.

- [57] BRANDÃO, C.J.; BOTELHO, M.J.C.; SATO, M.I.Z.; LAMPARELLI, M.C. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras - água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília: Athalaia, 2011. 326 p.
- [58] EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/SOLOS, 2011. 225 p.
- [59] JACKSON, M. L. **Soil chemical analysis**. New York: Prentice Hall, 1958. 498 p.
- [60] ESTEVE-TURRILLAS, F.A.; AMAN, C.S.; PASTOR, A. LA GUARDIA, M. Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, n. 1, p. 73–78, 2004.
- [61] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Brasília: INMETRO, 2011. 20 p.
- [62] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, E.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- [63] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de maio de 2012. Seção 1, p.93.
- [64] BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172–175, 2001.
- [65] SILVA, B.M.; BENETTI, F.; REZENDE, M.O.O. Comparative study of glyphosate and AMPA determination in environmental samples by two green methods. **OALib**, v. 2, n. 6, p. 1–11, 2015.
- [66] BENETTI, Fernanda. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação multirresíduo de glifosato e AMPA via CG-EM em amostras ambientais**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- [67] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 46 p.
- [68] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 4 maio 2013.

- [69] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1, p.56.
- [70] BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro de 2011. Seção 1, p.39.
- [71] LUCHESE, E.B.; FAVERO, L.O.B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo**: teoria e prática. 2a. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2002. 159 p.
- [72] TAVARES, R. L. M.; NAHAS, E. Humic fractions of forest, pasture and maize crop soils resulting from microbial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 963–969, 2014.
- [73] VIEIRA, E.M.; PRADO, A.G.S.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 305–308, 1999.
- [74] YU, Y.L.; WU, X.M.; LI, S.N.; FANG, H.; ZHAN, H.Y.; YU, J.Q. An exploration of the relationship between adsorption and bioavailability of pesticides in soil to earthworm. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 3, p. 428–33, 2006.
- [75] RAMPAZZO, N.; RAMPAZZO TODOROVIC, G.; MENTLER, A.; BLUM, E.H. Adsorption of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils. **International Agrophysics**, v. 27, n. 2, p. 203–209, 2013.
- [76] CALVET, R. Adsorption of organic chemicals in soils. **Environmental Health Perspectives**, v. 83, p. 145–177, 1989.
- [77] SHAHEEN, S. M.; TSADILAS, C. D.; RINKLEBE, J. A review of the distribution coefficients of trace elements in soils: Influence of sorption system, element characteristics, and soil colloidal properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 201-202, p. 43–56, 2013.
- [78] RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption process**. New York: John Wiley, 1984. 159 p.
- [79] TEIXEIRA-NETO, É.; TEIXEIRA-NETO, Â. A. Modificação química de argilas: desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 809–817, 2009.
- [80] OLIVEIRA JUNIOR R.S.; REGITANO, J.B. Dinâmica de pesticidas no solo. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L.R.F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo**. Viçosa: SBCS, 2009. p. 188–248.
- [81] SENESI, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. **The Science of the Total Environment**, v. 123-124, p. 63–76, 1992.

- [82] SMERNIK, R. J.; KOOKANA, R.S. The effects of organic matter-mineral interactions and organic matter chemistry on diuron sorption across a diverse range of soils. **Chemosphere**, v. 119, p. 99-104, 2015
- [83] DELLE SITE, A. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 30, n. 1, p. 187–439, 2001.
- [84] PESSOA, M.C.P.Y.; SCRAMIN, S.; CHAIM, A.; FERRACINI, V.L. **Transporte de agrotóxicos usados no Brasil por modelos screening e planilha eletrônica**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007. 24 p.
- [85] SPADOTTO, C.A.; FILIZOLA, H.F.; GOMES, M.A.F. Avaliação do potencial de lixiviação de pesticidas em latossolo da região de Guaíra, SP. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 127–136, 2001.
- [86] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181: Solo – Análise Granulométrica**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, 1984. 13 p.
- [87] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6457: Amostras de solo - preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, 1986. 9 p.
- [88] VIEIRA, Heulla Pereira. **Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa**. 2005. 76 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- [89] TRAAS, T.P.; SMIT, C.E. **Environmental risk limits for aminomethylphosphonic acid (AMPA)**. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environmental, 2003. 23 p.
- [90] TAVARES, M.C.H., LANDGRAF, M.D.; VIEIRA, E.M.; REZENDE, M.O.O. Estudo da adsorção-dessorção da trifluralina em solo e em ácido húmico. **Química Nova**, v. 19, n. 6, p. 605–608, 1996.
- [91] ISMAIL, B. S.; MAZLINDA, M.; TAYEB, M. A. Adsorption, desorption and mobility of cypermethrin and deltamethrin in malaysian soils. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 3, n. 4, p. 23–29, 2013.
- [92] OUDOU, H. C.; HANSEN, H. C. B. Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite. **Chemosphere**, v. 49, n. 10, p. 1285–1294, 2002.

- [93] PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of glyphosate by humic substances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2442–2446, 1996.
- [94] PICCOLO, A.; CELANO, G.; PIETRAMELLARA, G. Adsorption of the herbicide glyphosate on a metal-humic acid complex. **Science of The Total Environment**, v. 123-124, p. 77–82, 1992.
- [95] BENETOLLI, L.O.B.; SANTANA, H.; CARNEIRO, C.E.A.; ZAIA, D.A.M.; FERREIRA, A.S.; PAESANO JÚNIOR, A.; ZAIA, C.T.B.V. Adsorption of glyphosate in a forest soil: a study using Mossbauer and FTIR spectroscopy. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 855–859, 2010.
- [96] JABEEN, F.; CHAUDHRY, A.S.; MANZOOR, S.; SHAHEEN, T. Examining pyrethroids, carbamates and neonicotinoids in fish, water and sediments from the Indus River for potential health risks. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 2, 2015.
- [97] MONTANHA, F.P.; PIMPÃO, C.T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 58, 2012.
- [98] ALBERS, C.N.; BANTA, G.T.; HANSEN, P.E.; JACOBSEN, O.S. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil - Comparing different soils and humic substances. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 10, p. 2865–70, 2009.
- [99] DELMONICO, E.L.; BERTOZZI, J.; SOUZA, N.E.; OLIVEIRA, C.C. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 3, p. 513, 2014.
- [100] FREIRE, R.; SCHNEIDER, R.M.; FREITAS, F.H.; BONIFÁCIO, C.M.; TAVARES, C.R.G. Monitoring of toxic chemical in the basin of Maringá stream. **Acta Scientiarum Technology**, v. 34, n. 3, p. 295–302, 2012.
- [101] APARÍCIO, V.C.; GERÓNIMO, E.D.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE, P.; COSTA, J. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, p. 1866-1873, 2013.
- [102] SIMONSEN, L.; FOMSGAARD, I.S.; SVENSMARK, B.; SPLIID, N.H. Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 43, n. 5, p. 365–375, 2008.
- [103] OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATIZTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. 474 p.

- [104] DUX, J. P.; STALZER, R. F. **Managing safety in the chemical laboratory**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. 144 p.
- [105] COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.
- [106] ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana**, n. Especial, p. 95–107, 2010.
- [107] ALBINATI, A.C.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; SANTOS, G.B.; LIRA, A.D. Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, p. 184–192, 2007.
- [108] CORREIA, F.V.; MOREIRA, J.C. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, n. 3, p. 264–268, set. 2010.
- [109] WANG, Y.; WU, S.; CHEN, L.; WU, C.; YU, R.; WANG, Q.; ZHAO, X. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v. 88, n. 4, p. 484–91, 2012.
- [110] LANDGRAF, M. D.; MESSIAS, R. A.; REZENDE, M. O. O. **A importância ambiental da vermicompostagem: vantagens e aplicações**. São Carlos: Rima, 2005. 106 p.
- [111] OLIVEIRA, E. M.; COSTA, F. X.; COSTA, C. C. Reprodução de minhoca (*Eisenia foetida*) em diferentes substratos. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 5, p. 146–150, 2008.
- [112] LOURENÇO, N. M. G. **Características da minhoca epígea Eisenia foetida - Benefícios, características e mais-valias ambientais decorrentes da sua utilização**. 2010. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/FuturambGSR/caractersticas-da-minhoca-epgea-eisenia-foetida-benefcios-caractersticas-e-maisvalias-ambientais-decorrentes-da-sua-utilizao>>. Acesso em: 6 jun 2013.
- [113] GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 34, p. 36–43, 2005.
- [114] MELO, I. S. DE; AZEVEDO, J. L. DE. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647 p.
- [115] VAN STEMPTVOORT, D.R.; LESAGE, S.; NOVAKOWSKI, K.; MILLAR, K.; BROWN, S.; LAWRENCE, J. Humic acid enhanced remediation of an emplaced diesel source in groundwater.: 1. Laboratory-based pilot scale test. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 54, n. 3-4, p. 249–276, 2002.

- [116] CARNEIRO, D. D. A.; GARIGLIO, L. P. A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. **Tecer**, v. 3, p. 82–95, 2010.
- [117] LOURENÇO, N. M. G.; COELHO, S. I. D. **Vermicompostagem e qualidade ambiental**. São Bartolomeu de Messines: Futuramb, 2010. 118 p.
- [118] SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 112, n. 2, p. 269–283, 2001.
- [119] MENDES, L.A.; BUCATER, L.F.P.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Role of organic matter in the adsorption/desorption of Cr, Cu and Pb in competitive systems in two different soils. **OALib**, v. 1, n. 7, p. 1–5, 2014.
- [120] PEREIRA, M.D.G.; SOUZA NETA, L.C.; FONTES, M.P.F.; SOUZA, A.N.; MATOS, T.C.; SACHDEV, R.L.; SANTOS, A.V.; SOUZA, M.O.G.; ANDRADE, M.V.A.S.; PAULO, G.M.M.; RIBEIRO, J.N.; RIBEIRO, V.F.N. An overview of the environmental applicability of vermicompost: From wastewater treatment to the development of sensitive analytical methods. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-14, 2014.
- [121] EUROPEAN COMMISSION. **Report on the implementation of the Soil Thematic Strategy and ongoing activities**. 2014. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/soil/three_en.htm>. Acesso em: 24.abr. 2015.
- [122] BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução CONAMA nº 420/2009, de 28 de dezembro de 2009. **Diário Oficial da União**, 30 de dezembro de 2009. Seção 1, p.81.
- [123] WEBER, Saulo Henrique. **Desenvolvimento de nova função densidade de probabilidade para avaliação de regeneração natural**. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Departamento de Engenharia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- [124] WILLCOX, W. The founder of statistics. **Review of the International Statistical Institute**, v. 5, n. 4, p. 321–328, 1938.
- [125] VIEIRA, S. **Análise de variância: ANOVA**. São Paulo: Atlas, 2006. 216 p.
- [126] MILONE, G. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Centage Learning, 2009. 498 p.
- [127] BROCH, Siomara Cristina. **Aspectos teóricos e computacionais das estatísticas do teste de Dunnett não-central**. 2013. 241 f. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agropecuária) - Departamento de Estatística, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

- [128] BROCH, S. C.; FERREIRA, D. F. Algoritmo utilizando quadraturas gaussianas para a obtenção das probabilidades do teste bilateral de Dunnett para dados balanceados. **TEMA - Tendências em Matemática Aplicada e Computacional**, v. 14, n. 2, p. 209–219, 2013.
- [129] MCHUGH, M. L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica**, v. 21, n. 3, p. 203–209, 2011.
- [130] COTTA, J.A.O.; SALAMI, F.H.; MARQUES, A.R.; REZENDE, M.O.O.; LANDGRAF, M.D. Validação do método para determinação de nitrogênio kjeldahl total. **Revista Analytica**, n. 26, p. 68–75, 2007.
- [131] FIALHO, Lucimar Lopes. **Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos**. 2007. 170 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [132] RODELLA, A. A.; ALCARDE, J. C. Avaliação de materiais orgânicos empregados como fertilizantes. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 556–562, dez. 1994.
- [133] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11268-2: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction**. Genebra, 1998. 21 p.
- [134] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11268-1: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*) - Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate**. Genebra, 1993. 18 p.
- [135] AMERICAM SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the *Enchytraeid* potworm *Enchytraeus albidus***. West Conshohocken, 2012. 26 p.
- [136] MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**. Brasília, 2013. 26 p.
- [137] PIGATIN, L.B.F.; SANTOS, A.; BENETTI, F.; FERRER, R.S.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Study of humification dynamics of organic residues on vermicomposting process. In: XU, J.; WU, J.; HE, Y. (Ed.). **Functions of natural organic matter in changing environment**. Zheijiang: Springer, 2012. p. 653 - 656.
- [138] PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo**. São Paulo: Nobel, 2002. 363 p.

- [139] LONGO, A.D. **Minhoca**: de fertilizadora do solo à fonte alimentar. São Paulo: Ícone, 1987. 79 p.
- [140] CHERUBIN, M.R.; FRANCO, A.L.C.; CERRI, C.E.P.; OLIVEIRA, D.M.S.; DAVIES, C.A.; CERRI, C.C. Sugarcane expansion in Brazilian tropical soils - Effects of land use change on soil chemical attributes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 211, p. 173–184, 2015.
- [141] SILVA, B.M.; OLIVEIRA, G.C.; SERAFIM, M.E.; SILVA, E.A.; FERREIRA, M.M.; NORTON, L.D.; CURI, N. Critical soil moisture range for a coffee crop in an oxidic latosol as affected by soil management. **Soil Tillage Research**, v. 154, p. 103–113, 2015.
- [142] EVARISTO, L M.; INOJOSA, F.C.P.; AMORIM, M.N.; OLIBEIRA, C. **Relatório de acidentes ambientais 2013**. Brasília, IBAMA, 2014. 36 p.
- [143] BARBOSA, V. **Quatro casos trágicos de contaminação de solos**. 2011. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/mundo/noticias/4-casos-chocantes-de-contaminacao-de-solo-no-pais>>. Acesso em: 12 jun 2013.
- [144] GERDENITS, D.; SILVA, R.C.; FERREIRA, R.P.; GODOY, W.R.L. Áreas contaminadas e a gestão do passivo ambiental: Estudo de caso Shell Paulínia. **Revista de Gestão Integrada em Saude do Trabalho e Meio Ambiente**, v.4, n. 2, p. 22, 2009.
- [145] SHI, Y.; SHI, Y.; WANG, X.; LU, Y.; YAN, S. Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulase activity in earthworms (*Eisenia fetida*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 1, p. 31–38, 2007.
- [146] SANTADINO, M.; COVIELLA, C.; MOMO, F. Glyphosate sublethal effects on the population dynamics of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 12, p.1-8, 2014.
- [147] GARCÍA-PÉREZ, J. A.; ALARCÓN-GUTIÉRREZ, E.; PERRONI, Y., BAROIS, I. Earthworm communities and soil properties in shaded coffee plantations with and without application of glyphosate. **Applied Soil Ecology**, v. 83, p. 230–237, 2013.
- [148] GARCÍA-TORRES, T.; GIUFFRÉ, L.; ROMANIUK, R.; RÍOS, R.P.; PAGANO, E.A. Exposure assessment to glyphosate of two species of annelids. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 209–214, 2014.
- [149] VERGNOUX, A.; GUILIANO, M.; DI ROCCO, R.; DOMEIZEL, M.; THÉRAULAZ, F.; DOUMENQ, P. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. **Environmental Research**, v. 111, n. 2, p. 205–214, 2011.

- [150] BURLAKOV, J.; KLAVINS, M.; OSINSKA, L.; PURMALIS, O. The impact of humic substances as remediation agents to the speciation forms of metals in soil. **APCBEE Procedia**, v. 5, p. 192–196, 2013.
- [151] VAN TRUMP, J. I.; RIVERA VEGA, F. J.; COATES, J. D. Natural organic matter as global antennae for primary production. **Astrobiology**, v. 13, n. 5, p. 476–82, 2013.
- [152] KAH, M.; BROWN, C. D. Adsorption of ionisable pesticides in soils. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 188, p. 149–217, 2006.
- [153] SANTOS, C.; FRAGA, M.E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 168–175, 2010.
- [154] STEVENSON, J. F. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: John Wiley, 1994. 496 p.
- [155] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. São Paulo: LTC, 2006. 506 p.
- [156] NIEMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J. M. Characterization of humic acids, composts and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 130–135, 1992.
- [157] COTTA, Jussara Aparecida de Oliveira. **Aplicação de vermicompostagem para a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2008. 199 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [158] CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A. **Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. Campos dos Goytacazes: Editora da Universidade Federal do Norte Fluminense, 2005. 309 p.
- [159] KONONOVA, M. M. **Soil organic matter**. Oxford: Pergamon, 1966. 544 p.
- [160] SENESI, N.; MIANO, T.M.; PROVENZANO, M.R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 152, n. 4, p. 259–271, 1991.
- [161] MILORI, D.M.B.P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V.S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, n. 11, p. 1–11, 2002.

- [162] KALBITZ, K.; GEYER, W.; GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances - a reflection of land use history in a fen area. **Biogeochemistry**, v. 47, p. 219–238, 1999.
- [163] SPARKS, D. L.; PAGE, A.L.; HELMKE, P.A.; LOEPPERT, R.H.; SOLTANPOUR, P.N.; TABATABAI, M.A.; JOHNSTIN, C.T.; SUMNER, M.E. **Methods of soil analysis**: chemical methods. Madison: Soil Science Society of America - American Society of Agronomy, 1996. v. 100.
- [164] MC PHIE, P. Enzyme purification and related techniques: dialysis. In: WILSON, K.L.; SONNENBERG, A. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1971. p. 23–32.
- [165] CORRÊA, J. C.; MAUAD, M.; ROSOLEM, A. Fósforo no solo e desenvolvimento de soja influenciados pela adubação fosfatada e cobertura vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 1, p. 1231–1237, 2004.
- [166] SOUZA, W. J. O.; MELO, W. J. Teores de nitrogênio no solo e nas frações da matéria orgânica sob diferentes sistemas de produção de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 1, p. 885–896, 2000.
- [167] EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**: conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 30 p. (Nota técnica).
- [168] ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABAKERLI, R.B.; SOUZA, L.S. Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 157–164, 2003.
- [169] AMALFITANO, C.; PIGNALOSA, V.; AURIEMMA, L.; RAMUNNI, A. The contribution of lignin to the composition of humic acids from a wheat-straw amended soil during 3 years of incubation in pots. **Journal of the Soil Science**, v. 43, n. 3, p. 495–504, 1992.
- [170] FIALHO, L.L.; SILVA, W.T.L.; MILORI, D.M.B.P.; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L. Characterization of organic matter from composting of different residues by physicochemical and spectroscopic methods. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1927–1934, 2010.
- [171] CASTALDI, P.; ALBERTI, G.; MERELLA, R.; MELIS, P. Study of the organic matter during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. **Waste Management & Research**, v. 25, p. 209–213, 2005.

- [172] MANGRICH, A. S.; LOBO, M.A.; TANCK, C.B.; WYPYCH, F.; TOLEDO, E.B.S.; GUIMARÃES, E. Criterious preparation and characterization of earthworm-composts in view of animal waste recycling. Part I. correlation between chemical, thermal and FTIR spectroscopic analyses of four humic acids from earthworm-composted animal manure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 2, p. 164–169, 2000.
- [173] FREIXO, A. A.; CANELLAS, L. P.; MACHADO, P. L. O. A. Propriedades espectrais da matéria orgânica leve-livre e leve intra-agregado de dois latossolos sob plantio direto e preparo convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 3, p. 445–453, 2002.
- [174] FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. . Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 146–150, 1997.
- [175] FILHO, R. B.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A. **Recomendações sobre a utilização da técnica de derivação para aumento de resolução em espectros de FTIR de proteínas**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 1998. 4 p.
- [176] HUANG, H.; GUO, W.; CHEN, H. In situ FTIR and generalized 2D IR correlation spectroscopic studies on the crystallization behavior of solution-cast PHB film. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 1, p. 279–288, 2011.
- [177] GUERRA-LÓPEZ, J. R.; GÜIDA, J. A.; DELLA VÉDOVA, C. O. Infrared and Raman studies on renal stones: The use of second derivative infrared spectra. **Urological Research**, v. 38, n. 5, p. 383–390, 2010.
- [178] MIANO, T.M.; PICCOLO, A.; CELANO, G.; SENESI, N. Infrared and fluorescence spectroscopy of glyphosate-humic acid complexes. **The Science of the Total Environment**, v. 124, p. 83–92, 1992.