

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

Avaliação ecotoxicológica de herbicidas empregado no cultivo de arroz irrigado,  
desenvolvimento e validação de método analítico para detecção e quantificação  
de bentazona em água

PAULA RODRIGUES DE SOUSA

Lorena – SP

2016

PAULA RODRIGUES DE SOUSA

Avaliação ecotoxicológica de herbicidas empregado no cultivo de arroz irrigado,  
desenvolvimento e validação de método analítico para detecção e quantificação  
de bentazona em água

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de  
Lorena, Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área  
de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Dra. Teresa Cristina Brazil de Paiva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP

Março, 2016

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sousa, Paula Rodrigues

Avaliação ecotoxicológica de herbicidas empregado no cultivo de arroz irrigado, desenvolvimento e validação de método analítico para detecção e quantificação de bentazona em água / Paula Rodrigues Sousa; orientadora Teresa Cristina Brazil de Paiva ed. reimp., corr. - Lorena, 2016.  
101 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016  
Orientadora: Teresa Cristina Brazil de Paiva

1. Pesticidas. 2. Validação analítica. 3. Hplc - uv vis. 4. Ecotoxicidade. 5. Cultivo de arroz irrigado.  
I. Título. II. Paiva, Teresa Cristina Brazil de , orient.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, que foram muitos, por toda força, sabedoria, calma e clareza, para superar as dificuldades encontradas;

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado;

À Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, à todos do departamento de Biotecnologia Industrial;

À orientadora, Prof. Dra. Teresa Cristina Brazil de Paiva;

Ao Prof. Dr. Frank Pereira de Andrade, pelas discussões e tratamento de dados indispensáveis, que muito enriqueceram este trabalho;

Ao Prof. Dr. Morun Bernardino Neto, pelo conhecimento estatístico;

Aos alunos de mestrado e doutorado do laboratório de ecotoxicologia, que de alguma forma contribuíram para a realização e concretização deste trabalho;

Aos meus amigos, Rossana e Luiz, que estiveram ao meu lado nesta caminhada, trazendo descontração ao ambiente, pelas discussões e troca de conhecimento; pelo apoio e incentivo sempre;

À técnica do laboratório de ecotoxicologia, Lucinha, por toda contribuição, dedicação, por sempre disponibilizar um olhar carinhoso;

Ao técnico do laboratório de materiais lignocelulósicos, Cléber Matheus Tomazi, por toda ajuda e disponibilidade, por toda alegria.

Ao meu noivo, Renato Freire Jr, por sempre estar presente, ser gentil, pelo apoio e amor incondicional;

À minha Querida Família, Sousa Rodrigues, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo;

À todos que estiveram ao meu lado, apoiando, torcendo e contribuindo para a realização e concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

SOUSA, R.P. **Avaliação ecotoxicológica de herbicidas empregado no cultivo de arroz irrigado, desenvolvimento e validação de método analítico para detecção e quantificação de bentazona em água** 2016. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidades de São Paulo, Lorena, 2016.

O modelo produtivo da Revolução Verde iniciado no pós-guerra, buscou elevar a produtividade agrícola, com o discurso de suprir as necessidades alimentares de uma crescente população mundial, instalando novas tecnologias que utilizam fertilizantes e pesticidas a fim de garantir elevada produção no campo. A cultura de arroz irrigado, desde o século XX, é a principal atividade agrícola da região do Vale do Paraíba, exibindo uso contínuo de pesticidas com o intuito de combater as pragas. Os recursos hídricos são os mais afetados devido à agricultura exigir elevado suprimento de água, conduzindo o desenvolvimento das riziculturas próximo aos rios. O comprometimento destes recursos naturais gera prejuízos às espécies aquáticas e a saúde humana, principalmente quando são utilizados para abastecimento público. Tal situação exige controle e estudos que possibilitem o monitoramento de pesticidas no ambiente e, que possibilitem conhecer e determinar os efeitos tóxicos que são causados aos organismos, em decorrência da exposição a estas substâncias químicas. Novos métodos analíticos com sensibilidade e robustez adequados, que correlacionem o desenvolvimento e a otimização de maneira lógica e organizada, devem ser desenvolvidos e validados a fim de possibilitar a quantificação confiável destes compostos em água. Neste sentido, este trabalho propôs um estudo para avaliar toxicidade dos ingredientes ativo, bentazona e glifosato, empregados nas culturas de arroz irrigado localizadas no município de Canas/SP, sobre os organismos aquáticos *Daphnia similis* e *Pseudokirchneriella subcaptata*. Assim como, o desenvolvimento e a validação de um método cromatográfico para a determinação de bentazona em água. Os resultados da avaliação da toxicidade mostraram que o bentazona e o glifosato apresentaram toxicidade aguda a *D. similis* em concentrações  $\geq 0,3$  e  $4,4 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. No estudo da toxicidade crônica a *P. subcaptata*, o bentazona mostrou-se tóxico nas concentrações analisadas, ocasionando até 86% de inibição do crescimento algáceo. O glifosato agiu positivamente sobre a biomassa algal, o crescimento aumentou em 186 a 268 % de acordo com as concentrações avaliadas. O método cromatográfico foi desenvolvido e validado seguindo os principais guias de validação analítica, INMETRO, ANVISA, EURACHEM e IUPAC. A faixa linear, obtida após a validação do método, encontra-se compreendida entre  $0,12$  a  $6,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) determinados foram de  $0,08$  e  $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Aplicando o método cromatográfico desenvolvido, foi possível determinar resíduos de bentazona em amostras de água coletada do Rio Canas, obtendo concentrações que variaram de  $0,199$  a  $5,524 \text{ mg L}^{-1}$  durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015.

Palavras – chave: Pesticidas; Validação analítica; HPLC – UV-VIS; Ecotoxicidade; Cultivo de arroz irrigado.

## ABSTRACT

SOUSA, R.P. **Toxicological evaluation of herbicides used in rice cultivation, development and validation of analytical method for the detection and quantification of bentazone in water** 2016. 101p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidades de São Paulo, Lorena, 2016.

The production model of the Green Revolution started after the war, sought to raise agricultural productivity, with the speech to meet the food needs of a growing world population, installing new technologies that use fertilizers and pesticides to ensure high production in the field. The cultivation of rice, from the twentieth century is the main agricultural activity of the Paraíba Valley region, displaying continuous use of pesticides in order to combat pests. Water resources are the most affected due to the agriculture requiring high water supplies, leading the development of riziculturas close to rivers. The commitment of these natural resources generates losses to aquatic species and human health, especially when used for public supply. This situation requires control and studies for pesticide monitoring in the environment and to enable know and determine the toxic effects that are caused to organisms, as a result of exposure to these chemicals. New analytical methods with sensitivity and robustness appropriate, to correlate the development and optimization of logical and organized manner, must be developed and validated to allow reliable quantification of these compounds in water. In this sense, this paper proposed a study to evaluate the toxicity of active ingredients, bentazon and glyphosate employed in rice crops located in the municipality of Canas / SP on aquatic organisms *Daphnia similis* and *Pseudokirchneriella subcaptata*. As the development and validation of a chromatographic method for the determination of bentazone in water. The results of the evaluation of toxicity and showed that bentazone glyphosate had acute toxicity to *D. similis* at concentrations  $\geq 0.3$  and  $4.4 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. In the study of chronic toxicity *P. subcaptata*, the bentazone proved toxic in the concentrations examined, leading to 86% inhibition of algal growth. Glyphosate act positively on the algal biomass, increased growth in 186 to 268% according to the concentrations tested. The chromatographic method was developed and validated following the main tabs of analytical validation, INMETRO, ANVISA, EURACHEM and IUPAC. The linear range, obtained after the validation of the method, is in the range from  $0.12$  to  $6.00 \text{ mg L}^{-1}$ . The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined from  $0.08$  to  $0.12 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. Applying the chromatographic method developed, it was possible to determine bentazone residues in water samples collected from the Rio Canas, obtaining concentrations ranging from  $0.199$  to  $5.524 \text{ mg L}^{-1}$  during the months of October, November and December 2015.

Keywords: Pesticides; Analytical validation; HPLC – UV-VIS; Ecotoxicity; Cultivation of rice.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação ambiental dos pesticidas.....	19
Tabela 2 - Classificação toxicológica dos pesticidas.....	19
Tabela 3 - Portaria do MS nº 2.911/2011 .....	20
Tabela 4 - Portaria do MS nº 518/2004 .....	20
Tabela 5 - Parâmetros de classificação de risco de contaminação de águas superficiais aplicando o método de Goss .....	32
Tabela 6 - Normas padronizadas da CETESB e ABNT .....	47
Tabela 7 - Concentrações de glifosato utilizado no teste de toxicidade aguda.....	50
Tabela 8 - Concentrações de bentazona utilizado no teste de toxicidade aguda .....	51
Tabela 9 - Modo de preparo do teste de toxicidade crônica utilizando bentazona .....	52
Tabela 10 - Modo de preparo do teste de toxicidade crônica utilizando glifosato .....	53
Tabela 11 - Propriedades físico-químicas dos ingredientes ativos bentazona e glifosato .....	66
Tabela 12 - Resultados das análises estatísticas aplicadas para verificar a normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos de regressão .....	71
Tabela 13 - Limites de detecção e de quantificação para bentazona.....	77
Tabela 14 - Resultados obtidos para repetitividade e precisão intermediária para bentazona.....	78
Tabela 15 - Resultados obtidos na avaliação da robustez do método para detecção e quantificação de bentazona (média $\pm$ desvio padrão relativo, n = 3).....	79
Tabela 16 - Teores de bentazona obtidos em amostras de água coletadas no Rio Canas durante os meses outubro, novembro e dezembro de 2015 (média $\pm$ desvio padrão, n = 3) .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Bentazona .....	22
Figura 2 - Diagrama esquemático representando a estrutura do complexo do PSII .....	23
Figura 3 - Fluxo de elétrons no PSII .....	24
Figura 4 - Bentazona e seus principais metabolitos e produtos de degradação.....	25
Figura 5 - Estrutura química do Glifosato e seu principal metabólito AMPA.....	26
Figura 6 - Ação do glifosato na síntese de aminoácidos essenciais .....	27
Figura 7 - Mecanismo de ação do glifosato.....	28
Figura 8 - Mecanismos envolvidos na sorção do glifosato .....	29
Figura 9 - Vias de decomposição microbiológica do glifosato .....	30
Figura 10 - Relação sinal/ruído para limite de detecção e quantificação .....	38
Figura 11 - Ilustração de erros sistemáticos (a) situação de pequeno erro sistemático com resultados fora da meta (b) situação de erro sistemático maior com resultados dentro da meta .....	42
Figura 12 - Principais cultivos de arroz irrigado localizados no município de Canas .....	55
Figura 13 - Carta-controle <i>Daphnia similis</i> .....	61
Figura 14 - Carta-controle <i>P. subcaptata</i> .....	61
Figura 15 – Resultado do teste de toxicidade aguda com glifosato.....	62
Figura 16 – Resultado do teste de toxicidade aguda com bentazona.....	62
Figura 17 – Resultado do teste de toxicidade crônica com glifosato .....	64
Figura 18 - Resultado do teste de toxicidade crônica com bentazona.....	64
Figura 19 - Espectro referente a absorvância do bentazona, 1,00 mg L <sup>-1</sup> , na região do UV-VIS.....	68
Figura 20 - Gráfico dos resíduos de regressão para bentazona nos três meios estudados .....	70
Figura 21 - Gráfico normal QQ dos resíduos de regressão do bentazona nos meios estudados....	72
Figura 22 - Curva analítica para bentazona em água mili-q .....	74
Figura 23 - Curva analítica para bentazona em água do Rio Canas.....	74
Figura 24 - Curva analítica para bentazona em água da nascente.....	74
Figura 25 - Cromatograma referente a linearidade obtida para bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1 .....	75
Figura 26 - Cromatograma referente as injeções de água mili-q, do Rio Canas e da nascente não fortificadas com bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1 .....	76
Figura 27 - Cromatograma referente as injeções de água mili-q, do Rio Canas e da nascente, fortificadas na concentração de 1 mg L <sup>-1</sup> de bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1. ...	76
Figura 28 - Cromatograma referente a sobreposição das injeções de bentazona, 1 mg L <sup>-1</sup> , nos três meios analisados, com relação sinal/ruído acima de 3:1.....	76
Figura 29 - Cromatograma referente a injeção de bentazona, 1 mg L <sup>-1</sup> , com relação sinal/ruído acima de 3:1. ....	80
Figura 30 - Cromatograma referente a amostra 2, bentazona 0,199 mg L <sup>-1</sup> , coletada no Rio Canas no mês de outubro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1.....	82
Figura 31 - Cromatograma referente a amostra 7, bentazona 3,560 mg L <sup>-1</sup> , coletada no Rio Canas no mês de novembro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1 .....	82
Figura 32 - Cromatograma referente a amostra 9, bentazona 5,524 mg L <sup>-1</sup> , coletada no Rio Canas no mês de novembro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1 .....	82

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
2	Objetivo.....	13
2.1	Objetivos Específicos.....	13
2.2	Justificativa.....	13
3	Fundamentação Teórica.....	15
3.1	Pesticidas, Breve Histórico.....	15
3.2	Legislação Prevista aos Pesticidas.....	16
3.3	Classificação dos Pesticidas.....	18
3.4	Monitoramento dos Pesticidas no Brasil.....	19
3.5	Pesticidas em estudo.....	21
3.5.1	Bentazona.....	21
3.5.1.1	Mecanismo de ação do Bentazona.....	22
3.5.2	Glifosato.....	25
3.5.2.1	Mecanismo de ação do Glifosato.....	26
3.5.2.2	Degradação do Glifosato no solo.....	29
3.6	Estimativa de Risco de Contaminação Ambiental Teórica.....	30
3.6.1	Análise de Risco de Contaminação de Águas Superficiais.....	32
3.6.2	Análise de Risco de Contaminação de Águas Subterrâneas.....	32
3.7	Validação do Método Analítico.....	33
3.7.1	Características de desempenho do método.....	35
3.7.1.1	Seletividade.....	35
3.7.1.2	Limite de detecção e Limite de quantificação.....	36
3.7.1.3	Linearidade e Faixa de trabalho.....	38
3.7.1.4	Sensibilidade analítica.....	40
3.7.1.5	Precisão.....	40
3.7.1.6	Exatidão.....	42
3.7.1.7	Robustez.....	43
3.8	Ecotoxicologia.....	44
3.8.1	O ambiente aquático.....	45
3.8.2	Testes de toxicidade com organismos aquáticos.....	46
4	Materiais e Métodos.....	50
4.1	Análises Ecotoxicológicas.....	50
4.1.1	Ensaio toxicidade aguda com microcrustáceo <i>Daphnia Similis claus</i> .....	50
4.1.2	Ensaio de toxicidade crônica com a alga <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> .....	51
4.2	Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas.....	53

4.3	Estudo das condições cromatográficas e Extração em fase sólida para detecção e quantificação do herbicida bentazona .....	54
4.3.1	Preparo das soluções.....	54
4.3.2	Seleção do comprimento de onda do Bentazona .....	54
4.3.3	Coleta e Preservação das amostras.....	54
4.3.4	Preparo da amostra e Procedimento de extração em fase sólida (SPE) .....	55
4.4	Validação do método desenvolvido para detecção e quantificação do herbicida bentazona em água .....	56
4.4.1	Limite de detecção e Limite de quantificação .....	56
4.4.2	Linearidade e Efeito Matriz .....	57
4.4.3	Sensibilidade analítica .....	57
4.4.4	Exatidão .....	57
4.4.5	Precisão .....	58
4.4.6	Robustez .....	59
5	Resultados e Discussão.....	60
5.1	Toxicidade aguda e crônica utilizando <i>D. similis</i> e <i>P. subcaptata</i> .....	60
5.1.1	Avaliação da sensibilidade dos organismos-teste .....	60
5.1.2	Toxicidade aguda .....	61
5.1.3	Toxicidade Crônica.....	63
5.2	Análise de risco de contaminação ambiental teórica .....	66
5.3	Validação do método cromatográfico desenvolvido .....	68
5.3.1	Faixa Linear e Efeito de Matriz .....	69
5.3.2	Limites de Detecção e Limites de Quantificação.....	77
5.3.3	Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária) e Exatidão (recuperação).....	77
5.3.4	Robustez do Método .....	78
5.4	Aplicação do método desenvolvido para a determinação de Bentazona .....	79
6	Conclusões.....	86
7	Perspectivas futuras .....	87
	Referências .....	88

# 1 Introdução

Desde que iniciou-se o registro de pesticidas, em 1947, aproximadamente 20 mil produtos passaram a ser comercializados (RASMUSSEN et al., 2015). Atualmente, mais de 85 mil compostos químicos estão em produção e uso em todo o mundo, destes, 2200 são produzidos em quantidades superiores a 450 toneladas (STOKSTAD; GRULLON<sup>1</sup>, 2013 apud MCKNIGHT et al., 2015).

O crescimento exponencial do consumo de pesticidas no Brasil, foi estimulada pelas políticas implantadas pelo governo na década de 1960, que forneceram substancial subsídio para grandes proprietários de terra interessados em cultura de soja, cana-de-açúcar, milho e café (MIRANDA et al., 2007<sup>2</sup> apud PEDLOWSKI et al., 2012).

Em 2008, o Brasil se tornou o maior consumidor mundial de pesticidas utilizando mais de 700 mil toneladas de produtos químicos, gerando uma receita de 7,1 bilhões de dólares para a indústria química. Os pesticidas no Brasil estão disponíveis por meio de 1079 produtos com 470 I.A, os quais são divididos em herbicidas (45%), inseticidas (27%), e fungicidas (28%) (PEDLOWSKI et al., 2012).

O termo pesticida abrange uma vasta gama de compostos que podem ser tipicamente classificados com base na sua ação incluindo, além dos já citados acima, os nematicidas, os reguladores do crescimento da planta, entre outros. Podem ser, também, classificados em função da sua natureza química, como os organofosforados e organoclorados, ou ainda, classificados quanto ao seu mecanismo de ação (ARIAS-ESTEVEZ et al., 2008<sup>3</sup> apud PEDLOWSKI et al., 2012).

Os pesticidas são amplamente utilizados na agricultura visando controlar as pragas e assim, aumentar a proteção e o rendimento das culturas, sendo também, empregados em programas de proteção à saúde para controlar vetores de doenças (ALI et al., 2014). Os principais produtos utilizados comercialmente são compostos orgânicos sintéticos com alevada atividade biológica. Apesar de sua importância reconhecida, especialmente nos dois aspectos supramencionados, os pesticidas são considerados compostos nocivos que ocasionam efeitos adversos sobre a saúde e o ecossistema (YADAV et al., 2015).

---

<sup>1</sup> STOKSTAD; GRULLON, G., 2013. Infographic: pesticide planet. A global look at the uses, benefits, and drawbacks of pesticides. *Science*, v. 341, p. 730 e 731.

<sup>2</sup> MIRANDA, A.C. et al., 2007. Neoliberalism, pesticide consumption and food sovereignty crisis in Brazil. *Cien. Saúde Colet.* v. 12, p. 7 e 14.

<sup>3</sup> ARIAS-ESTÉVEZ. et al., 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* v.123, p. 247 e 260.

De acordo com o relatório elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) juntamente com o Programa das Nações Unidas para o meio ambiente (UNEP), aproximadamente 200 mil pessoas morrem e cerca de 3 milhões são envenenadas por pesticidas anualmente, sendo 95% desses casos em países em desenvolvimento. Como resultado dos graves efeitos ocasionados a saúde, alguns destes pesticidas, como os organoclorados, tem tido sua utilização proibida em muitos países (SHARMA et al., 2014; YADAV et al., 2015).

Numerosos estudos de monitoramento e análise de risco em todo o mundo tem demonstrado o potencial dos pesticidas em contaminar águas superficiais e subterrâneas (CEREJEIRA et al., 2003; CLARCK; GOOLSBY, 2000; GOTZ et al., 1998; <sup>4</sup>apud PAPADAKIS et al., 2015). Os pesticidas entram em contato com águas superficiais principalmente, via escoamento superficial, deriva e drenagem. A quantidade de pesticida que é perdido dos campos de agricultura e transportado para água depende de vários fatores, incluindo, características do solo, topografia, clima (especialmente em períodos de chuvas intensas) e propriedades físico-química dos compostos (SCHULZ, 2001).

Com a finalidade de proteger os ecossistemas de água doce, as jurisdições de muitos países estabeleceram critérios de qualidade da água e começaram a exigir uma avaliação de risco ambiental antes do registro do pesticida. Por exemplo, na Europa, os testes para avaliar os riscos ambientais ocasionado por um determinado pesticida, antes da sua colocação no mercado, estão descritos no documento de Orientação da União Européia sobre Ecotoxicologia Aquática (SANCO/10329/2002, 2002). No Brasil, a avaliação de risco ambiental de pesticidas esta prevista na Portaria do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) n° 84/1996 e, posteriormente, na regulamentação da Lei n° 7802 pelo Decreto n° 4074/2002 (SANTOS et al., 2010).

A descoberta de resíduos de pesticidas em vários compartimentos do ambiente tem levantado sérias preocupações relacionada à sua utilização (SHARMA et al., 2014). Sabendo disto e tendo conhecimento da periculosidade que os mesmos apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade, torna-se necessário intensificar estudos que possibilitem o monitoramento de possíveis contaminações no ambiente, bem como motivar o desenvolvimento de métodos analíticos, visando a identificação e quantificação destes micropoluentes.

---

<sup>4</sup> GOETZ, A.; LAVY, T. & GBUR, E. (1990). Degradation and Field persistence of imazethapyr. **Weed Science**, v. 38, No. 2, p. 421-428, ISSN 1550-2759.

## 2 Objetivo

Avaliação da toxicidade e risco de contaminação ambiental dos herbicidas, bentazona e glifosato, empregados nas culturas de arroz irrigado, localizadas no município de Canas/SP. E o desenvolvimento e validação de método cromatográfico para determinação de bentazona em água.

### 2.1 Objetivos Específicos

Determinação da toxicidade da bentazona e glifosato por meio de testes de toxicidade aguda e crônica com os organismos aquáticos *Daphnia similis* e *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Avaliação preliminar do risco de contaminação da água superficial e subterrânea pelos herbicidas em estudo, empregando o método de screening EPA, o groundwater ubiquity score (índice de GUS) e o método Goss.

Desenvolvimento e validação de método cromatográfico, a fim de determinar bentazona na água do Rio Canas, que recebe a drenagem da água das plantações de arroz irrigado localizadas em Canas/SP.

### 2.2 Justificativa

Os pesticidas são desenvolvidos visando potencializar suas características químicas de maneira específica e tóxica a certos tipos de insetos, animais, plantas ou fungos. Embora esta letalidade, na maioria das vezes, seja direcionada, estes compostos químicos podem causar sérios danos a organismos não alvos (VEIGA et al., 2006).

A contaminação por pesticidas ocorre, tanto pontualmente, como em áreas adjacentes às regiões de aplicação, podendo atingir locais distantes do ponto de partida. Analisando as propriedades físico-químicas destes compostos, é possível na maioria das vezes, estimar seu comportamento no meio ambiente, as interações com o solo, o transporte, a tendência de escoamento superficial quando dissolvidos em água ou associados ao sedimento (TOSCANO et al., 2000; SPADOTTO, 2006).

Os recursos hídricos, são os mais afetados com a contaminação por pesticidas, devido à grande utilização destes compostos na agricultura e, devido ao fato de que, a atividade agrícola exigir elevado suprimento de água, conduzindo o desenvolvimento, por exemplo, da rizicultura próximo a rios e lagos (LOURENCETTI et al., 2005).

Diversos estudos (NOGUEIRA et al., 2012; VEIGA et al., 2006), comprovaram que a presença destes compostos nos sistemas hídricos é mais comum do que se imagina, principalmente, nos que estão localizados próximos de regiões agrícolas que empregam uso intenso e intermitente de pesticidas. O comprometimento destes recursos naturais gera graves prejuízos ao ambiente aquático e à saúde humana. Tal situação exige controle e, estudos de monitoramento de pesticidas no ambiente que possibilitem conhecer e determinar, os efeitos tóxicos que são causados aos organismos em decorrência da exposição a estas substâncias químicas.

A cultura de arroz irrigado é a principal atividade agrícola existente na região Vale do Paraíba, exibindo relevante importância econômica/social e apresentando uso contínuo de pesticidas. O município de Canas – SP encontra-se localizado no eixo Rio de Janeiro – São Paulo – Minas Gerais, entre os municípios de Lorena e Cachoeira Paulista, as margens do Rio Paraíba do Sul (RPS). Possui dois rios que abastecem a cidade, o Canas e o Caninhas, que juntos somam uma área de 70 Km<sup>2</sup>. A economia do município é diversificada com destaque a pecuária, horticultura e a rizicultura, exibindo extensas áreas destinadas ao cultivo de arroz irrigado.

A rizicultura presente no município de Canas apresenta o sistema de cultivo de polders utilizando água do Rio Canas, afluente do RPS, para realizar o alagamento e manter a lâmina d'água dentro das quadras de arroz. A drenagem da água do cultivo é contínua e, junto desta, resíduos de pesticidas e fertilizantes podem ser liberados diretamente no Rio Canas. Esta dinâmica vem ocorrendo a décadas e, muito pouco se sabe sobre a influência e os impactos que este evento ocasiona diretamente ao Rio Canas e, indiretamente, ao RPS. Diante disso, tem-se o interesse em determinar e conhecer os riscos de contaminação ambiental, a ecotoxicidade e a ocorrência dos herbicidas em uso na rizicultura, na água do Rio Canas.

### 3 Fundamentação Teórica

#### 3.1 Pesticidas, Breve Histórico

Os primeiros registros de uso de pesticidas datam de 2500 anos a.C, quando os agricultores começaram a utilizar compostos à base de enxofre para eliminar as pragas presentes nas culturas. O desenvolvimento e aplicação de pesticidas foi iniciado após a Segunda Guerra Mundial, até então, os pesticidas consistiam essencialmente de substâncias inorgânicas, derivados de fontes naturais e apresentavam grandes quantidades de metais, por exemplo, arsênio, chumbo e cobre (GALHANO et al., 2011; MCKNIGHT et al., 2015)

A indústria química ganhou força em 1939, a partir da descoberta das propriedades do diclorodifeniltricloroetano (DDT), pelo entomologista suíço Paul Muller, que obteve o Prêmio Nobel em Medicina devido ao uso do DDT no combate à malária, ao tifo e posteriormente, a outras doenças humanas transmitidas por insetos. O DDT é um inseticida organoclorado extremamente eficaz que foi sintetizado pelo químico alemão Othmar Zeidler, em 1874 (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

A produção em grande escala do DDT iniciou-se em 1945. Nesta época, era considerado um dos compostos químicos mais eficaz, barato e com amplo espectro de ação (TOMITA, 2005). Na agricultura, foi utilizado como inseticida por aproximadamente 20 a 25 anos. A quantidade de DDT empregada neste período foi elevada, estimando-se que cada cidadão norte-americano tenha ingerido através da alimentação, em média  $0,28 \text{ mg dia}^{-1}$  de DDT (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002)

Em 1962, Rachel Carson sugeriu em seu livro “Primavera Silenciosa”, que o uso intensivo do DDT poderia ser a principal causa da redução populacional de diversas aves, muitas delas pertencentes ao topo da cadeia alimentar. Este livro é considerado a primeira manifestação ecológica contra o uso indiscriminado do DDT (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

A Suécia foi o primeiro país do mundo a banir a utilização do DDT e outros inseticidas organoclorados, em 1º de janeiro de 1970, baseado em estudos ecológicos. No Brasil, as primeiras medidas restritivas se deram em 1971, com a Portaria nº 356/71, que proibiu a fabricação e comercialização do DDT e do hexaclorobenzeno (BHC) para controle de ectoparasitas em animais domésticos. Em 1985, a comercialização, o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados a agricultura, foi proibida em todo território nacional. Contudo, os inseticidas organoclorados ainda são permitidos em

campanhas de saúde pública no combate a vetores de agentes etiológicos (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

Os organofosforados, triazinas, carbamatos e pirenídeos foram desenvolvidos nas décadas de 1930 e 1940, primeiramente, para serem utilizados como armas químicas durante a Segunda Guerra Mundial. Em seguida, foram empregados como pesticidas. Estes compostos são considerados mais estáveis e menos persistentes no ambiente que os organoclorados e com mecanismo de ação mais específico (TERRA; PELAEZ, 2007).

Os primeiros compostos introduzidos em 1970 foram adaptados para conter apenas substância orgânica, sem a presença de metais e foram desenvolvidos para alvos específicos, como desregulação endócrina e inibição no transporte de elétrons. São frequentemente utilizados em modernas áreas agrícolas e urbanas devido a excepcional atividade do pesticida. Contudo, a seletividade destes compostos químicos ocasionou um aumento da resistência das pragas, levando necessidade de empregar estratégias de gestão para combater este efeito negativo, juntamente com desenvolvimento de novas classes de praguicidas com I.A diferentes (TERRA; PELAEZ, 2007).

Atualmente, os pesticidas tem sido desenvolvido com a utilização da engenharia genética, sendo hipoteticamente, mais seguros do que os compostos previamente desenvolvidos. Porém, os seus impactos no ambiente são ainda desconhecidos podendo atuar sobre organismos não alvos (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

A crítica ao uso dos pesticidas causa progressivo aumento pela procura da agricultura orgânica, que encontra-se em ascensão. Com início na década de 1970, hoje, a agricultura orgânica ou agroecológica, pode representar uma estratégia competitiva frente às grandes propriedades agroexportadoras (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

### 3.2 Legislação Prevista aos Pesticidas

Nos diversos decretos, leis e portarias que orientam o uso de pesticidas, em diferentes momentos históricos, são percebidas 3 fases distintas: a primeira, que perdurou até meados da década de 60, quando os pesticidas não eram amplamente utilizados e seu conceito era de produto saneante, demonstrando sua ampla aceitação pela população. Na segunda fase que se estendeu até os anos 80, na qual estes compostos eram denominados de defensivos agrícolas. Nesta fase, se percebia uma certa conscientização da população sobre a toxicidade destes compostos que coincidiu com o período de implantação da "Revolução verde" no Brasil. Em meados dos anos 80 iniciou-se a terceira fase, onde a denominação "pesticida" generalizou-se e, a preocupação com os efeitos

tóxicos a saúde humana e ao meio ambiente se fez mais presente, gerando leis que dispõem de forma mais rigorosa sobre o tema (TOMITA, 2005).

A legislação referente aos pesticidas é contemplada mais de perto pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que foi regulamentada pelo Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro 1990 e atualizada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que juntamente com as portarias do Ministério Público nº 3, de 16 de janeiro de 1992 e nº 14, de 24 de janeiro de 1992, abrangem de uma forma geral o tema referente aos produtos químicos aplicados na agricultura. O Decreto nº 4.074/02 dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulação, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização, importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de pesticidas, seus componentes e afins (NORMAS JURÍDICAS..., 1989).

A Lei nº 7.802 define os pesticidas como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

Segundo o Decreto nº 4074/02, art. 7, são três os ministérios envolvidos na avaliação de pleitos de registro no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA); o Ministério da Saúde (MS), através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (ANVISA); e o Ministério do Meio Ambiente (MMA) através do IBAMA (SILVA; COSTA, 2010).

O MAPA, além de avaliar a eficiência agrônômica dos pesticidas, é o órgão que concede o registro federal. A ANVISA realiza a avaliação de potencial tóxico à saúde humana e, encaminha seu parecer ou Informe de Avaliação Toxicológica (IAT) ao MAPA. O IBAMA, por sua vez, faz a avaliação ambiental, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental (PPA) (SILVA; COSTA, 2010).

Após o registro federal, para que o produto esteja à disposição e apto para comercialização, é feito, através do órgão responsável, o cadastro estadual. Compete aos estados e ao Distrito Federal legislar sobre o uso, a produção, o consumo, o comércio e o armazenamento dos pesticidas, bem como, a fiscalização sobre todos os processos

citados, além do transporte interno. Os municípios ficam incumbidos da legislação supletiva sobre o uso e armazenamento desses produtos (CONSULTAS ..., 2015).

A Lei nº 7.802, assegura que a compra destes produtos somente poderá ocorrer com a apresentação do receituário agrônomo, que deve ser emitido por profissional legalmente habilitado (TOMITA, 2005). O artigo 9, do Decreto nº 4074/02, reafirma a necessidade deste receituário. Nesse deve constar a classe toxicológica à qual o produto pertence, além de dispor sobre o uso, a aplicação, a guarda e o destino final das embalagens e sobras do produto, no sentido de prevenir ou evitar danos à saúde pública e ao meio ambiente.

O artigo 41, do Decreto nº 4074/02, estabelece que as empresas que possuem registros de pesticidas no Brasil, ficam obrigadas a apresentar semestralmente aos órgãos registrantes um relatório de comercialização. Tais relatórios permitem o acompanhamento do volume de pesticidas comercializados no país, bem como, das importações e exportação (TOMITA, 2005).

### 3.3 Classificação dos Pesticidas

A classificação dos pesticidas pode ser expressa de acordo com alguns critérios como: a peste alvo do controle podendo agir contra plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), microrganismos de solo (nematicidas), moluscos (moluscicidas), entre outros; o grupo químico presente no composto, como, carbamatos, piretróides, organoclorados, organofosforados e triazinas; e o grau ou tipo de prejuízo ao meio ambiente e a saúde humana, estipulado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1995.

A avaliação e a classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) se baseia na toxicidade, nas características intrínsecas do composto e na capacidade da substância química em causar danos aos organismos. Para isso são realizados no mínimo 82 estudos (físico-químicos, ecotoxicológicos) do I.A e do produto formulado (comercialmente vendido). A partir da avaliação destes estudos é possível caracterizar o produto e, estimar o seu comportamento e destino ambiental, assim como, a toxicidade a diferentes organismos (AVALIAÇÃO ..., 2015).

A classificação do PPA é realizado pelo IBAMA através da avaliação dos relatórios obtidos por meio de todos os estudos realizados. A classificação se dá de I a IV, conforme Tabela 1, quanto menor a classe maior será o perigo de dano ambiental. Esta informação vem disponibilizada no rótulo das embalagens dos produtos e também nas bulas dos mesmos (AVALIAÇÃO... , 2015).

Tabela 1 - Classificação ambiental dos pesticidas

<b>CLASSE I</b>	<b>Produto altamente perigoso ao meio ambiente</b>
<b>CLASSE II</b>	<b>Produto muito perigoso ao meio ambiente</b>
<b>CLASSE III</b>	<b>Produto perigoso ao meio ambiente</b>
<b>CLASSE IV</b>	<b>Produto pouco perigoso ao meio ambiente</b>

Fonte: IBAMA, 2015

Quanto aos efeitos à saúde decorrentes da exposição humana a esses agentes, a classificação resulta em diferentes classes toxicológicas, que estão sumarizadas na Tabela 2. A toxicidade da maioria dos pesticidas é expressa em valores referentes à Dose Média Letal (DL<sub>50</sub>), por via oral, representada por miligramas do I.A do produto, por quilograma de peso vivo necessário para matar 50% da população de ratos ou de outro animal teste. A DL<sub>50</sub> é usada para estabelecer as medidas de segurança a serem seguidas, para reduzir os riscos que o produto pode vir a apresentar à saúde humana (SCORZA, 2006)

Tabela 2 - Classificação toxicológica dos pesticidas

<b>Classe toxicológica</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Faixa colorida</b>
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5.000	Verde

DL<sub>50</sub> = Dose Média Letal

Fonte: Ribas; Matsumura, 2009.

### 3.4 Monitoramento dos Pesticidas no Brasil

A contaminação da água, dita potável, por uma enorme variedade de substâncias tóxicas utilizadas na agricultura é uma realidade. A política adotada pelo ministério da saúde para controlar a qualidade da água a ser consumida pela população, está baseada no estabelecimento de limites “aceitáveis” de resíduos ou seja, os valores máximos permitido (VMP). Atualmente, a Portaria do MS nº 2.914 de 12/12/2011, dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Nesta portaria consta uma lista (Tabela 3), com alguns pesticidas e seus respectivos VMP em água (PORTARIA..., 2011). Nesta lista não há dados para a bentazona, porém na Portaria do MS nº 518/2004 (Tabela 4), anterior a atual, consta o VMP para bentazona que é de 0,300 mg L<sup>-1</sup> (PORTARIA..., 2004).

Tabela 3 - Portaria do MS nº 2.911/2011

<b>Pesticidas</b>	<b>VMP <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>
Glifosato + AMPA	500
Lindano (gama HCH)	2
Mancozebe	180
Metamidofós	12
Metolacloro	1
Molinato	6
Parationa Metílica	9
Pendimentalina	20
Permetrina	20
Profenofós	60
Simazina	2
Tebuconazol	180
Terbufós	1,2
Trifluralina	20

VMP = Valor Máximo Permitido

Fonte: Portaria do MS nº 2.914/2011, 2011.

Tabela 4 - Portaria do MS nº 518/2004

<b>Pesticidas (Ingrediente ativo)</b>	<b>Limite permitido em <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>
Alaclor	20
Aldrin e Dieldrin	0,03
Atrazina	2
Bentazona	300
Clordano (isômeros)	0,2
2,4 D	30
DDT (isômeros)	2
Endossulfam	20
Endrin	0,6
Glifosato	500
Heptacloro e Heptacloro epóxido	0,03

Fonte: Portaria MS nº 518/2004, 2004.

Estudos recentes, (BRAUN et al., 2012; SILVA; CEREJEIRA, 2012; ZANELLA et al., 2011), têm mostrado a presença de pesticidas em matrizes aquosas e avaliado o perfil toxicológico destes compostos, principalmente em águas superficiais e subterrâneas. Nogueira et al. (2012), verificaram a presença dos pesticidas atrazina, clorpirifós,  $\alpha$ -endossulfam,  $\beta$ -endossulfam, flutriafol, malatiom e metolacloro, em água de áreas urbanas e rurais das cidades de Campo Verde e Lucas do Rio Verde, no estado do Mato Grosso, Brasil. Os resultados revelaram que as concentrações de atrazina, endossulfam e malatiom encontradas em algumas amostras de água superficial e subterrânea estavam acima dos níveis permitidos pela legislação brasileira. Estes resultados demonstram a vulnerabilidade dos recursos hídricos e apontam para o risco de contaminação de áreas de nascentes.

Em um trabalho realizado por, Battaglin et al. (2000), em áreas de sequeiro nos EUA, de um total de 130 amostras de águas superficiais analisadas, 108 (83%) continham pelo menos um herbicida pertencente ao grupo das sulfonamidas e imidazolinonas. Destes foi destacado a presença do herbicida imazetapir em 72% das amostras, demonstrando a elevada capacidade de transporte desse produto, que é amplamente utilizado na lavoura arrozeira gaúcha. Neste mesmo estudo foi detectado acetocloro, alacloro e atrazina em 95, 89 e 99% das amostras, respectivamente.

Aparecido et al. (2015), realizaram estudos para determinar a concentração ambiental do herbicida atrazina em cinco córregos localizados ao norte no estado de São Paulo e, avaliaram o impacto toxicológico deste herbicida em espécies jovens do peixe Pacu, *Piaractus mesopotamicus*. A concentração mais alta de atrazina observada foi de  $10,4 \mu\text{g L}^{-1}$ , ou seja, cinco vezes superior ao permitido pela Portaria nº 2.914/2011 que é de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ . Foram observadas muitas alterações histológicas no fígado e brânquias das amostras de peixes expostas ao herbicida.

Montagner et al. (2014), trabalharam no desenvolvimento de um método analítico para determinação em matriz aquosa de 12 pesticidas comumente empregados na agricultura, dentre estes destaca-se, tebuconazol, fipronil, atrazina e difenoconazol. A análise foi realizada em amostras de água superficial de 13 rios localizados no estado de São Paulo e em amostras de água tratada. Os resultados mostraram que a água dos rios investigados encontraram-se, principalmente impactadas, com os pesticidas carbendazim e atrazina, este último foi, também, detectado e quantificado na amostra de água tratada.

### 3.5 Pesticidas em estudo

#### 3.5.1 Bentazona

A bentazona, 2,2-dióxido de 3-isopropil (1H) - benzo-2,1,3-triadizin-4-ona,  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ , é um herbicida seletivo de ação sistêmica que apresenta classificação toxicológica nível I e ambiental III. Pertencente à classe benzotiadiazinona é utilizado no controle de plantas daninhas em culturas de soja, arroz e cereais. É estruturalmente (Figura 1) composto por duplo anel, um aromático e o outro heterocíclico contendo átomos de nitrogênio e enxofre (CARLOS; LIMA, 2003).

Figura 1 - Estrutura química da Bentazona



Fonte: Carlos; Lima, 2003.

O Basagran®, sintetizado e comercializado pela BASF, é dos produtos formulados que contém a bentazona como I.A. Este herbicida tem ação pós-emergente seletivo. É utilizado para controlar muitos infestantes de folha larga e ciperáceas principalmente pela ação de contato, apresentando pouco efeito sobre a germinação das sementes (POURATA et al., 2009). É perigoso se ingerido ou absorvido pela pele (GARRIDO; et al., 1998).

#### 3.5.1.1 Mecanismo de ação da Bentazona

A bentazona é classificado como um inibidor da fotossíntese. Geralmente, os inibidores de fotossíntese são divididos em dois grupos distintos: os inibidores de fotossistema I (PSI) e os inibidores da fotossistema II (PSII). A bentazona encaixa-se neste último grupo, no qual, ocorre a oxidação da água durante o processo fotossintético.

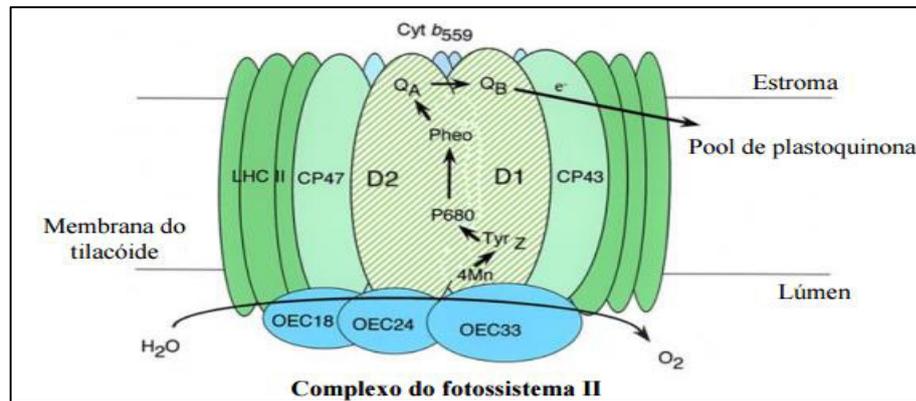
A fotossíntese é um processo realizado pelas plantas para obtenção de energia, convertendo gás carbônico e água em glicose e oxigênio. Esse processo sustenta a sobrevivência de praticamente toda vida no planeta. O mais ativo dos tecidos fotossintéticos das plantas superiores é o mesófilo e a bainha do feixe vascular, que encontram-se localizados na porção mediana das folhas das plantas.

As células desses tecidos mencionados possuem muitos cloroplastos que são formados por múltiplas camadas de membranas de tilacóides (granum), que se encontram rodeados por um meio líquido denominado estroma. Dentro dos tilacóides estão os complexos do fotossistema que são constituídos por pigmentos que absorvem energia (clorofila A e B, xantofilas e carotenoides) da luz do sol e, a encaminha para uma via com capacidade de sintetizar compostos ricos em energia (ATP e NADPH<sup>+</sup>) (PETERSON; AYLOR, 1995).

A captura e o armazenamento de energia luminosa pelas folhas das plantas superiores são mediados por uma intrincada associação entre, os complexos pigmentosos captadores de luz e um transporte sequencial de elétrons do PSII para o PSI (STEMLER; MURPHY, 1985).

O PSII é um complexo de multi-subunidades localizado nos tilacóides dos cloroplastos (Figura 2). É composto por mais de 30 proteínas codificadas por genomas do núcleo e do cloroplasto. Destas subunidades proteicas, as proteínas intrínsecas D1 e D2, são codificadas pelo cloroplasto, assim como, os componentes redox necessários nas reações fotoquímicas, como a tirosina, moléculas de clorofila a, feofitinas e plastoquinona  $Q_A$  e  $Q_B$  (BARBER, 1998).

Figura 2 - Diagrama esquemático representando a estrutura do complexo do PSII



Fonte: Khatoon, 2009.

A energia que é absorvida pelas moléculas de clorofila durante a fotossíntese é transferida para o centro de reação chamado de P680, emitindo um elétron no estado excitado (Figura 3). Esse elétron, primeiramente, é transferido para a feofitina e, então, para a  $Q_A$ , ligada a proteína D2. Essa transfere o elétron para  $Q_B$  (ROSS et al., 1996<sup>5</sup> apud MARCHI; SANTOS; GUIMARÃES, 2008). A  $Q_B$  é um receptor de elétrons que, quando devidamente encaixada em D1, recebe 2 elétrons de  $Q_A$ . Ao receber o primeiro elétron, fica reduzida. Quando o segundo elétron é transferido de  $Q_A$  para  $Q_B$ , a quinona reduzida torna-se protonada, originando plastohidroquinona ( $PQH_2$ ). A função de  $Q_A$  e  $Q_B$  é transferir elétrons entre PSII e um citocromo (Cyt) que, por sua vez, transfere elétrons para o PSI via plastocianina (PC) (VIDAL et al., 1997<sup>6</sup> apud MARCHI; SANTOS; GUIMARÃES, 2008).

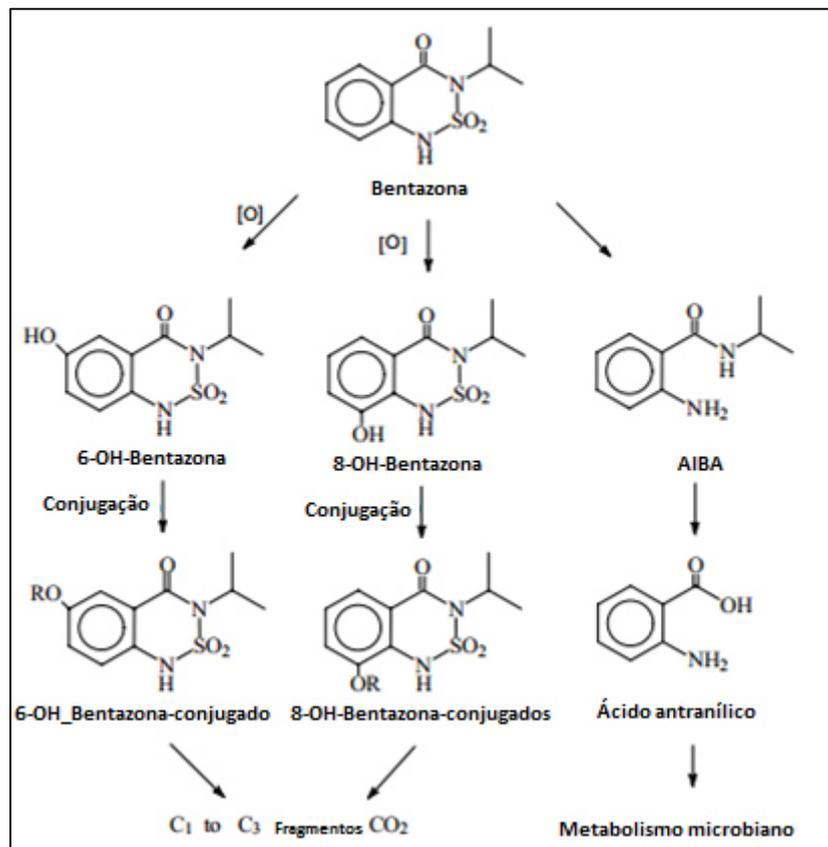
<sup>5</sup> ROSS, M. A.; CHILDS, D. J. Herbicide mode-of-action summary. Cooperative Extension Service Publication WS-23, Purdue University, West Lafayette, IN. 1996. Disponível em: <<http://www.btny.purdue.edu/weedscience/moa/index.html>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

<sup>6</sup> VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre, 1997. p. 165



O metabolismo da bentazona por microorganismos envolve a hidroxilação do carbono na posição 6 e 8 (C6 e C8) e subsequente conjugação com hidratos de carbono e incorporação em componentes naturais, tais como, proteínas e frações de polissacarídeos (amido, pectina, hemicelulose e celulose). Estes intermediários da degradação da bentazona, 6 e 8-OH-bentazona, são rapidamente metabolizados em comparação ao 2-amino-N-isopropil (AIBA), que é considerado muito móvel no ambiente. A Figura 4, ilustra os principais produtos da degradação da bentazona (MACEDO et al., 2008).

Figura 4 - Bentazona e seus principais metabolitos e produtos de degradação



Fonte: Macedo et al, 2008 adaptado de Huber; Otto, 1994.

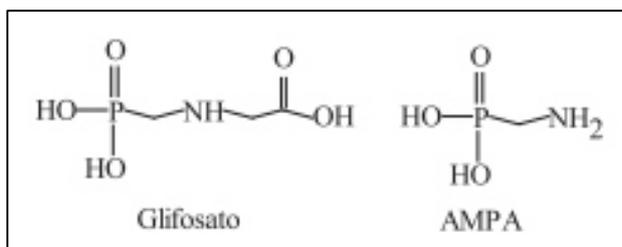
No ambiente, mais precisamente no solo, a dissipação da bentazona é dependente de fenômenos como: degradação por micro-organismos, lixiviação e escoamento superficial. A capacidade de contaminar águas superficiais está diretamente associada ao baixo coeficiente de adsorção no solo ( $K_d$  0,176 a 3,056), contribuindo para que resíduos do herbicida sejam facilmente arrastados para mananciais, águas superficiais e subterrâneas (MACEDO et al., 2008).

### 3.5.2 Glifosato

O glifosato, [N-(fosfometil)glicina], é uma herbicida que apresenta fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  (M.M 169,1 g mol<sup>-1</sup>). Em condições ambientais, tanto o glifosato

quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol. Foi originalmente sintetizado em 1964 como potencial quelante industrial e seu uso como herbicida foi descrito apenas em 1971. A Figura 5, mostra a estrutura química do glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilsulfônico (AMPA) (SOUZA; MATTA; ABREU, 2006).

Figura 5 - Estrutura química do Glifosato e seu principal metabólito AMPA



Fonte: Toni; De Santana; Zaia, 2006.

O glifosato é um herbicida não seletivo, sistêmico, que representa atualmente 60% do mercado mundial. Estima-se que no Brasil, o consumo seja de aproximadamente 200 milhões de litros por ano. É utilizado em culturas de soja, trigo, milho, algodão, feijão e arroz (POMPEO QUEIROZ et al., 2011). É classificado como uma glicina substituída e como um herbicida organofosfato, sem, no entanto, afetar o sistema nervoso humano, como frequentemente é observado em pesticidas organofosforados (em geral inseticidas inibidores da enzima acetilcolinesterase). O glifosato, apesar de ser citado como pouco tóxico (classificação toxicológica IV e ambiental III), há evidências de efeitos deletérios no ambiente após seu uso prolongado, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas (SOUZA; MATTA; ABREU, 2006).

É aplicado no estágio pós-emergente não exibindo atividade pré-emergente devido a elevada sorção ao solo, pois, uma vez que é fortemente sorvido torna-se não disponível para absorção pelas plantas. É considerado não seletivo em função do amplo espectro, embora, atualmente, pode ser considerado seletivo para as culturas geneticamente modificadas. No Brasil, esse herbicida é formulado com diferentes sais, como o potássico, isopropilamina e de amônio (TONI; DE SANTANA; ZAIA, 2006).

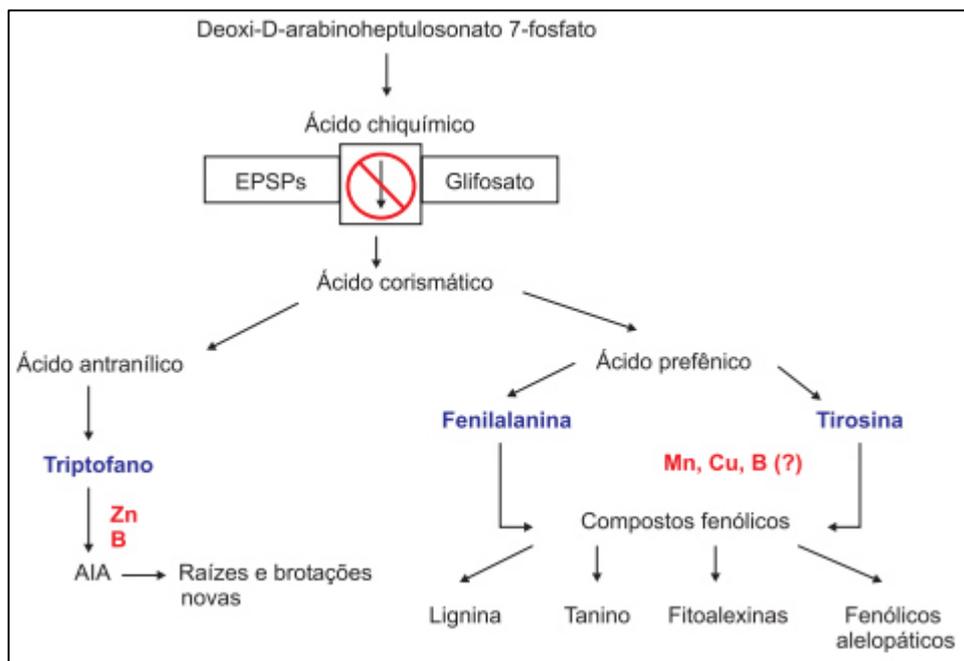
#### 3.5.2.1 Mecanismo de ação do Glifosato

Uma das mais importantes características do glifosato é sua rápida translocação das folhas da planta tratada para as raízes, rizomas e meristemas apicais. Esta propriedade sistêmica resulta na destruição total de plantas invasoras perenes, difíceis de matar, tais como rizomas de *Sorghum halepense*, *Agropyron repens*, *Cirsium arvense*, *Cyperus spp.*, *Cinodon dactylon*, *Imperata cilindrica* e *Pueraria lobata*. Os sintomas comuns observados

nas plantas invasoras, após a aplicação do glifosato, são clorose foliar seguida de necrose (GRUYS; SIKORSKI, 1999<sup>8</sup> apud YAMADA; CASTRO, 2007).

O mecanismo de ação do glifosato é bastante singular. Atua inibindo especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), que catalisa a condensação do ácido chiquímico ao fosfoenolpiruvilchiquimato (PEP). Conseqüentemente, inibe a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004<sup>9</sup> apud TONI; DE SANTANA; ZAIA, 2006; YAMADA; CASTRO, 2007). (Figura 6).

Figura 6 - Ação do glifosato na síntese de aminoácidos essenciais



Fonte: Adaptado de Graham; Webb, 1991 apud Yamada; Castro, 2007.

A inibição da enzima EPSPs afeta a via metabólica do Ácido chiquímico, que é responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano. Estes três aminoácidos, além de serem necessários para a síntese protéica, são os precursores de metabolitos secundários como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (WHETTEN; SEDEROFF, 1995<sup>10</sup> apud SOUZA; MATTA; ABREU, 2006; YAMADA; CASTRO, 2007).

<sup>8</sup> GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

<sup>9</sup> ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate and Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 825-831, 2004.

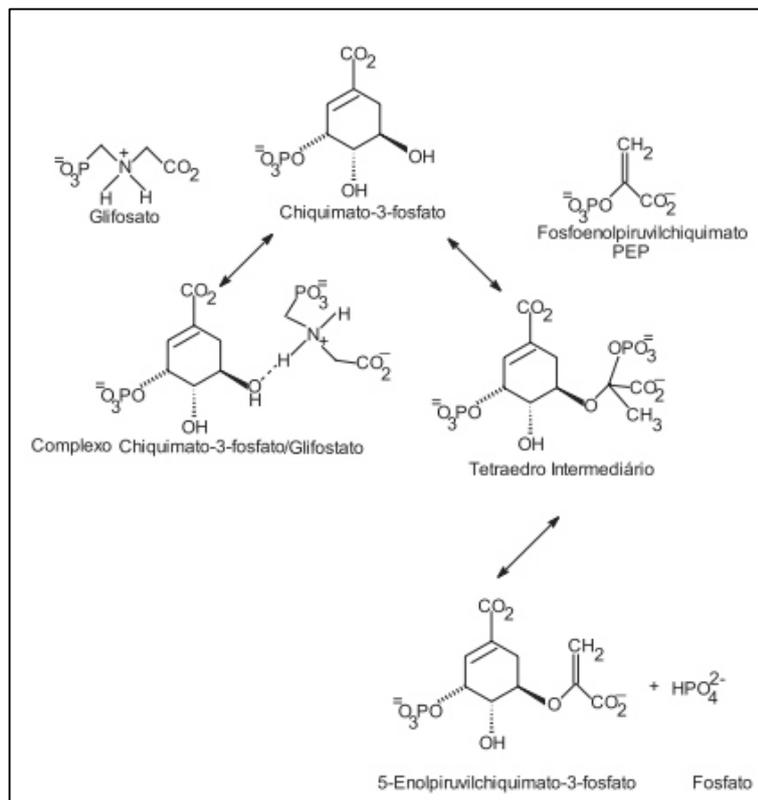
<sup>10</sup> WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**. Rockville, v. 7, p. 1001-1013, 1995.

A inibição da enzima EPSPs pelo glifosato, interfere no controle da entrada de carbono na via do Ácido chiquímico através do aumento da atividade da enzima 3-deoxi-Darabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS) (Figura 6). O aumento da atividade da DAHPS, ocorre aparentemente, devido aos baixos níveis de arogenato, que é um inibidor alostérico desta enzima, produzido posteriormente na rota do chiquimato. Com a redução da inibição por arogenato, DAHPS continua atuando, provocando acúmulo de chiquimato e a diminuição da síntese do aminoácidos essenciais a planta (YAMADA; CASTRO, 2007).

A enzima EPSPs catalisa a ligação entre os compostos chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvilchiquimato (PEP), produzindo enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico (Figura 7).

A EPSPs reage primeiramente com S3P, formando o complexo EPSPs-S3P. Em seguida, reage com o PEP. Em plantas susceptíveis e tratadas com glifosato, a molécula do herbicida não se liga a enzima livre, mas ao complexo EPSPs-S3P, impedindo a ligação do PEP, originando o complexo inativado EPSPs-S3P-glifosato (Figura 7). A afinidade do complexo EPSPs-S3P ao glifosato é, aproximadamente, 75 vezes maior do que com o PEP. A ligação e inibição do glifosato à enzima também acontece no citoplasma, onde EPSPs encontra-se como pré-enzima, formando o complexo glifosato-pEPSPs-S3P.

Figura 7 - Mecanismo de ação do glifosato

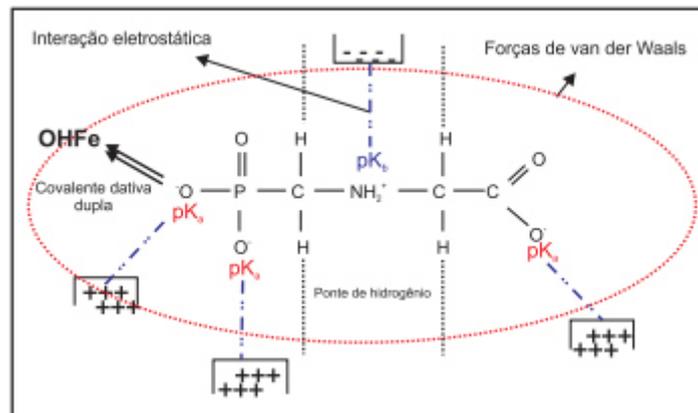


### 3.5.2.2 Degradação do Glifosato no solo

Moraes et al. (2010) mencionaram que no solo o glifosato é caracterizado pela sua elevada capacidade de sorção e que vários são os mecanismos que explicam este fenômeno, tais como, a troca de ligantes com óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al) e as ligações de hidrogênio com as substâncias húmicas.

Via de regra, quanto menor é a solubilidade em água de uma molécula, maior é a capacidade de sorção dessa no solo. A molécula do glifosato é altamente polar e apresenta baixa lipofilicidade. Porém, o comportamento do glifosato é a grande exceção dessa regra, pois é uma molécula altamente solúvel em água e extremamente sorvida. Esta sorção (Figura 8) está relacionada às forças de van der Waals, à formação de ligação de hidrogênio com as substâncias húmicas do solo, à troca iônica (o glifosato pode apresentar carga positiva e negativa ao mesmo tempo) e à formação de ligação covalente com os átomos metálicos, fazendo com que o glifosato permaneça no solo como um resíduo-ligado (ARANTES; LAVORENTE; TORNISIELO, 2011; YAMADA; CASTRO, 2007).

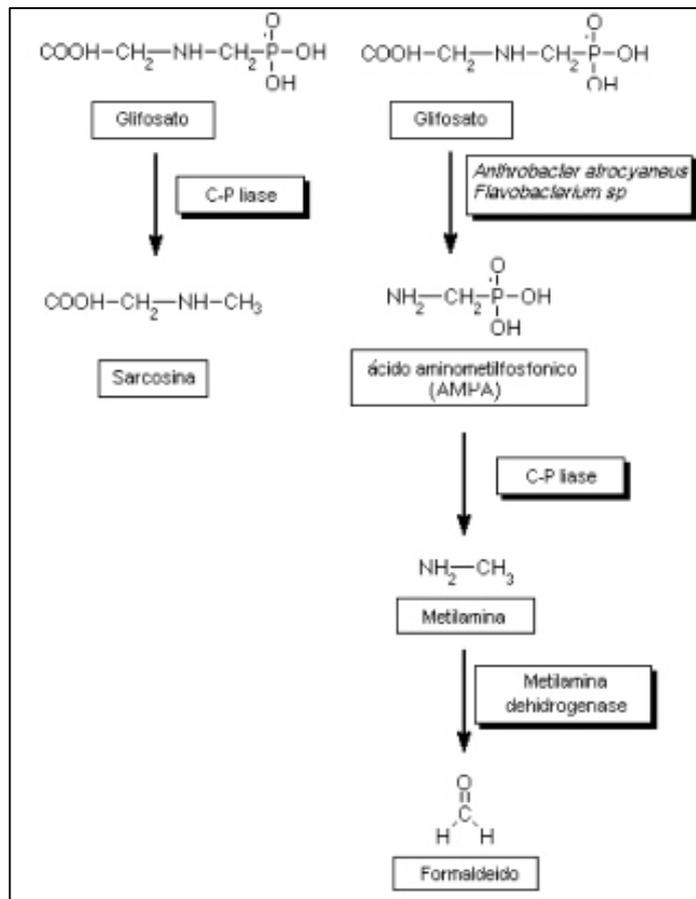
Figura 8 - Mecanismos envolvidos na sorção do glifosato



Fonte: Yamada; Castro, 2007.

A taxa de metabolismo do glifosato no solo, em geral, é inicialmente rápida seguida por um lento e prolongado período de degradação, que pode seguir duas rotas. A primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase). A sarcosina entra no metabolismo desses microrganismos, sendo posteriormente degradada. A segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico, AMPA, conforme apresentado na Figura 9 (AMARANTE; SANTOS, 2002).

Figura 9 - Vias de decomposição microbiológica do glifosato



Fonte: Amarante; Santos, 2002.

### 3.6 Estimativa de Risco de Contaminação Ambiental Teórica

A avaliação do potencial de risco ao meio ambiente pelo uso de pesticidas é uma importante etapa no processo de registro de pesticidas de vários países. Nos Estados Unidos, a Lei Federal de Controle de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act, FIFRA) fornece a base para a regulação, venda e distribuição dos pesticidas no país, além de possuir entre seus elementos chave, o registro destes produtos com base em um padrão de avaliação de riscos e benefícios. A publicação em 1998, do guia sobre avaliação de risco ecológico pela Agência Ambiental Americana (United States Environmental Protection Agency, USEPA), uma revisão da publicação de 1992, foi um marco para um novo paradigma na avaliação de risco ambiental (ANDRADE et al., 2011).

Na Europa, a Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção as Plantas (EPPO), desenvolveu guias de avaliação de risco ambiental de pesticidas com procedimentos flexíveis, que podem ser adaptados para serem usados de acordo com as prioridades dos países membros da comunidade europeia (REBELO; CALDAS, 2014).

No Brasil, a avaliação de risco ambiental dos pesticidas está prevista na Portaria IBAMA n° 84/1996, na Portaria Normativa, 1996 e, posteriormente, na regulamentação da Lei n° 7.802 pelo Decreto n° 4.074/2002. Inicialmente, o IBAMA concentrou seus esforços em estabelecer métodos para avaliação do potencial de perigo das substâncias, definindo protocolos de interesse e qualificando o processo de avaliação. Mais recentemente, o IBAMA passou a adotar a estrutura conceitual do processo de avaliação de risco ambiental definido pela USEPA na avaliação de novos I.A (SILVA; CEREJEIRA, 2012).

Uma vez que a estrutura química do I.A norteia a sua dinâmica no ambiente, incluindo sua mobilidade e degradabilidade, é possível estimar o potencial de contaminação da água, analisando as características físico-químicas dos ingrediente ativos, empregando a modelagem matemática. Os resultados da análise são apresentados na forma de índices e intervalos numéricos, tais como o método screening da Agência de Proteção Ambiental (EPA), o índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (índice GUS) e o método de Goss. Para estudos envolvendo o potencial de contaminação de águas subterrâneas podem ser utilizados outros modelos, dentre esses, o fator de retardamento RF (Retardation Factor) e de atenuação AF (Attenuation Factor), o índice LIX (Leaching Index) e o modelo TLPI (Temperature Leaching Potential Index) (ANDRADE et al., 2011).

Dores; Lamônica-Freire (2001), realizaram estudo sobre a contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Fizeram uma análise preliminar da possível contaminação de águas superficiais e subterrâneas, por I.A de pesticidas utilizados nos arredores da área urbana do município de Primavera do Leste, Mato Grosso do Sul. Os critérios EPA, índice GUS e o método de Goss, foram usados para avaliar quais os pesticidas poderiam contaminar as águas locais. Os resultados classificaram o glifosato como alto potencial de transporte associado ao sedimento (APTAS).

Mesquita Brito et al. (2001), efetuaram uma avaliação preliminar de pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros no Nordeste brasileiro, quanto ao risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas. Para tanto, foram utilizados os critérios sugeridos pela EPA, o índice GUS e o método de Goss. Os pesticidas tetradifon, triclorfon,  $\alpha$ -Endosulfan,  $\beta$ -Endosulfan, sulfato de endosulfan apresentaram potencial de contaminação de águas subterrânea e, o glifosato apresentou potencial de contaminação parcialmente positivo.

Soares et al. (2012), estimaram o risco de contaminação de mananciais por pesticidas utilizados em culturas de café. O estudo foi realizado no município de Manhuaçu, Minas Gerais. Os algoritmos de Goss e GUS foram utilizados para estimar o risco de

contaminação de águas superficiais e subterrâneas, respectivamente. Foram estudados várias classes de pesticidas, dentre essas, acaricidas, fungicidas, herbicidas e inseticidas.

### 3.6.1 Análise de Risco de Contaminação de Águas Superficiais

A análise de risco de contaminação de águas superficiais pode ser realizada utilizando o método de Goss. Esse propõe critérios que classificam cada I.A em alto, médio ou baixo potencial de contaminação associado ao sedimento ou dissolvido em água (PRIMEL et al., 2005).

Os parâmetros a serem considerados para alto ou baixo potencial de contaminação associado ao sedimento ou dissolvido em água estão sintetizados na Tabela 5. O pesticida é considerado como de médio potencial de contaminação, quando as propriedades físico-químicas não se enquadram nos parâmetro do método (MARTINI et al., 2012).

Tabela 5 - Parâmetros de classificação de risco de contaminação de águas superficiais aplicando o método de Goss

POTENCIAL DE TRANSPORTE ASSOCIADO AO SEDIMENTO			
	DT50 <sub>solo</sub>	K <sub>oc</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	S (mg L <sup>-1</sup> )
	≥ 40	≥ 1000	-
Alto potencial	≥ 40	≥ 500	≤ 0,5
	< 1	-	-
	≤ 2	≤ 500	-
	≤ 4	≤ 900	≥ 0,5
Baixo potencial	≤ 40	≤ 500	≥ 0,5
	≤ 40	≤ 900	≥ 2
POTENCIAL DE TRANSPORTE DISSOLVIDO EM ÁGUA			
	DT50 <sub>solo</sub>	K <sub>oc</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	S (mg L <sup>-1</sup> )
Alto potencial	> 35	< 100000	≥ 1
	< 35	≤ 700	≥ 10 e ≤ 100
	-	≥ 100000	-
Baixo potencial	≤ 1	≥ 1000	-
	< 35	-	< 0,5

DT50: meia-vida; K<sub>oc</sub>: coeficiente de adsorção à matéria orgânica; S: solubilidade em água

Fonte: Millhome et al., 2009 adaptado de Goss, 1992.

### 3.6.2 Análise de Risco de Contaminação de Águas Subterrâneas

O risco potencial de contaminação de águas subterrâneas pode ser avaliado empregando o índice GUS e o método de screening sugerido pela EPA (MILHOME et al., 2009).

O método de screening sugerido pela EPA, para a análise preliminar de risco de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas, considera os critérios citados abaixo. De acordo com estes critérios, os pesticidas são classificados como alto ou baixo potencial contaminante (ANDRADE et al., 2011).

- Solubilidade dos pesticidas em água (S)  $>30 \text{ mg L}^{-1}$ ;
- Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo ( $K_{oc}$ )  $< 300 - 500 \text{ mL g}^{-1}$ ;
- Constante da Lei de Henry ( $K_H$ )  $< 10^{-2} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$ ;
- Especificação (Esp): negativamente carregado a pH normal do ambiente (5 a 8);
- Meia-vida no solo  $> 14$  a 21 dias;
- Meia-vida na água  $> 175$  dias.

Na análise pelos critérios EPA, os I.A foram classificados, de acordo com o atendimento ou não, aos parâmetros supracitados. Sendo considerado potencial contaminante, o I.A que possui características físico-químicas que atendam a maioria dos critérios mencionados acima (ANDRADE et al., 2011).

O índice GUS é calculado por meio dos valores de meia-vida do composto no solo ( $DT_{50_{solo}}$ ) e do coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo ( $K_{oc}$ ), não levando em consideração outras propriedades, como solubilidade em água. Esse índice pode ser calculado empregando a Equação 1.

$$\text{GUS} = \log (DT_{50_{solo}}) \times (4 - \log K_{oc}) \text{ Equação (1)}$$

As faixas de classificação dos pesticidas pelo índice GUS, variam de acordo com a tendência à lixiviação do composto. Sendo, o índice  $\text{GUS} < 1,8$ : a espécie não sofre lixiviação;  $1,8 < \text{GUS} < 2,8$ : faixa de transição; se  $\text{GUS} > 2,8$ : provável lixiviação. Com o valor de GUS calculado, os I.A são classificados em uma destas categorias (ANDRADE et al., 2011).

### 3.7 Validação do Método Analítico

Quando se pensa em detectar e quantificar analitos que podem estar presente em uma determinada matriz em níveis traços, por exemplo, fármacos, hormônios e pesticidas em água, há a necessidade de demonstrar a qualidade das medições químicas, por meio da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade do método que está sendo empregado na análise. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, esse deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

A validação de um determinado método analítico é uma etapa obrigatória para verificar se o método que está sendo desenvolvido, é capaz de fornecer resultados precisos para a sua aplicação de rotina, assegurando, resultados de qualidade e confiabilidade adequada para tomada de decisões (ROZET et al., 2011).

O processo de validação, uma vez bem definido e documentado, oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. Assim, para o registro de novos produtos, os órgãos reguladores, do Brasil e de outros países, exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais. Estes documentos são diretrizes a serem adotadas no processo de validação, tais como, o guia Codex Alimentarius, Comissão sobre métodos de análise e amostragem; Critérios para avaliação de métodos aceitáveis de análise para fins Codex, da Comissão Europeia; guia de orientação de métodos analíticos sobre resíduos de métodos analíticos, SANCO/825/00; Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), entre outros.

Os conceitos que definem validação de métodos estão em constante evolução e algumas definições podem ser transcritas como:

- Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2011);
- A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2012);
- Validação do método é basicamente o processo de definição de uma exigência analítica e, confirmatório de que o método em questão tem capacidades consistentes com o que é requerido (EURACHEM, 2014).

Há duas abordagens principais para a validação de métodos, a primeira, chamada de validação no laboratório (in house validation), que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou, para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas

todos os parâmetros de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A segunda abordagem, denominada interlaboratorial, além de avaliar todas as características de desempenho, está compreendido ainda, com a realização de um estudo interlaboratorial. Esse estudo é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e, a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Somente assim, a metodologia poderá ser aceita como oficial para uma aplicação específica. No Brasil, os estudos de comparações interlaboratoriais são coordenados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), através do Programa Brasileiro de Metrologia em Química (RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### 3.7.1 Características de desempenho do método

Durante a validação de um método alguns parâmetros analíticos são normalmente estudados como: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, sensibilidade analítica, precisão, exatidão e robustez. Esses termos são denominados como parâmetros de desempenho analítico e, algumas vezes como, figuras analíticas de mérito. Esses critérios foram definidos e especificados pela Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) e agências regulatórias em todo o mundo (ARAUJO, 2009).

#### 3.7.1.1 Seletividade

Qualquer método analítico pode estar sujeito a sofrer interferências analíticas. Assim, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e, subsequente uso do método (ROZET et al., 2011).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma matriz. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como, a presença de outro I.A, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como, outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes na matriz (RIBANI et al., 2004).

É crucial estabelecer que a propriedade medida, por exemplo o pico de resposta, é exclusivamente devido ao analito de interesse e não de algo químico e/ou fisicamente semelhante, que causaria um viés no resultado mensurado (EURACHEM, 2014). Se a

seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (VESSMAN et al., 2001 <sup>11</sup>apud RIBANI et al., 2004).

Interferências podem causar desvios, efeitos, que podem aumentar ou diminuir o sinal que é atribuído ao analito. Estes efeitos podem ser chamados de “proporcional ou rotacional” e “translacional ou fixo”. O primeiro é caracterizado quando o tamanho do efeito para uma dada matriz é geralmente proporcional ao sinal obtido, ocasionando mudança na inclinação da curva de calibração, sem alterar a sua interceptação. O segundo, “translacional ou fixo”, é devido a interferências presentes na solução de ensaio, sendo no entanto, independente da concentração da substância a analisar. É referido como um “background” ou, interferência de “linha base” e atua afetando a interceptação da curva de calibração, mas não altera a inclinação (EURACHEM, 2014).

A seletividade pode ser obtida por meio de vários procedimentos analíticos, pode-se avaliar comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz com esta substância (padrão) presente. Nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão (RIBANI et al., 2004; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Algumas vezes não é possível obter a matriz isenta do analito de interesse. Então, a seletividade é obtida através do método de adição de padrão. É construída duas curvas analíticas, uma com a adição da substância de interesse na amostra e, outra sem a presença da matriz. Ao comparar as duas curvas analíticas, caso as inclinações sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, garantindo a seletividade do método (RIBANI et al., 2004).

#### 3.7.1.2 Limite de detecção e Limite de quantificação

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada. Porém, sem no entanto quantificar, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD é estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o menor nível detectável (ANVISA, 2010).

Em cromatografia, o LD, é a quantidade de analito injetada que resulta na obtenção de um pico cromatográfico com uma altura, pelo menos, duas ou três vezes maior que o

---

<sup>11</sup> VESSMAN, J. et al., Pure Appl. Chem., v. 73, p. 1381, 2001.

ruído de linha base do cromatografo. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: pelo método visual, método sinal/ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (GREEN et al., 2011).

No método visual, o LD é determinado utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo, que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Este procedimento também pode ser feito através do instrumento, utilizando parâmetros de detecção no método de integração.

O método de relação sinal/ruído, pode ser aplicado somente em equipamentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é realizada a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas da espécie de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do analito) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do LD (GREEN et al., 2011; RIBANI et al., 2004).

No método baseado em parâmetros da curva analítica, o LD pode ser expresso pela Equação 2, onde:  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco da equação da linha de regressão ou, do coeficiente linear da equação e,  $S$  é a inclinação (slope) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

$$\mathbf{LD = \frac{3,3 \times s}{S} \quad \text{Equação (2)}}$$

Frequentemente, o LD é confundido com a sensibilidade do método analítico. A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir pequenas diferenças na concentração ou massa do analito teste. Em termos práticos, a sensibilidade é o declive da curva de calibração que é obtido através da representação gráfica da resposta em função da concentração de analito (GREEN et al., 2011).

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão, sob condições experimentais estabelecidas (EURACHEM, 2014). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco de 6 a 15 replicatas mais 5, 6 ou 10 vezes os desvios-padrão (INMETRO, 2011).

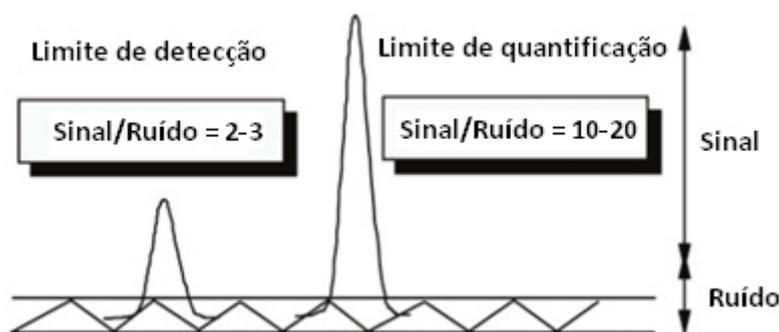
Ribani et al. (2004) e Rozet et al. (2011), relatam que os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1. Ou seja, o LQ pode ser calculado

utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou, ainda, a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LQ, a partir da Equação 3:

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad \text{Equação (3)}$$

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) determina um valor padrão para o fator multiplicador,  $k_Q$ , igual a 10 e, se o desvio padrão é aproximadamente constante em baixas concentrações, este fator aceita um desvio padrão relativo (RSD) igual a 10% (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Para fatores multiplicadores correspondentes a 5 ou 6, algumas vezes, são utilizados RSD igual a 20 e 17%, respectivamente (EURACHEM, 2014). A figura 10, ilustra a relação sinal/ruído para o LD e LQ.

Figura 10 - Relação sinal/ruído para limite de detecção e quantificação



Fonte: Green et al., 2011.

### 3.7.1.3 Linearidade e Faixa de trabalho

A capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, é definido como linearidade (ANVISA, 2010). A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.

A linearidade pode ser obtida por meio da padronização interna ou externa e, formulada matematicamente para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2011). A regressão linear (Equação 4) relaciona duas variáveis, onde “x” é a concentração e “y” a resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc). O parâmetro “a” representa a inclinação da curva de calibração e “b” significa a interseção com o eixo y, quando  $x = 0$ .

$$y = ax + b \quad \text{Equação (4)}$$

Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação “r”. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo da unidade, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados alguns testes como, o ajuste do modelo linear. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A Anvisa recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2012; INMETRO, 2007; RIBANI et al., 2004).

Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e, os valores calculados a partir da equação de regressão. Calcula-se o valor de t empregando a Equação 5.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r/\sqrt{n}} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: resíduo =  $|x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$ ;  $s_r$  = desvio padrão dos resíduos; n = número de pontos. Se o valor de t calculado para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t unilateral, para a confiança desejada e, (n-1) graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear (RIBANI et al., 2004). O teste de significância deve ser avaliado em conjunto com o gráfico residual e a homocedasticidade deve ser assegurada (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Após um ajuste exploratório, com regressão linear simples, os resíduos devem ser examinados. A heterocedasticidade é bastante comum em uma calibração analítica, sugerindo que os dados da calibração são melhor tratados por regressão linear ponderada (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

As diretrizes da ICH, ANVISA e GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) especificam que a linearidade deve ser determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes que não incluam o ponto zero da curva, que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa de RSD entre as injeções inferior a 5% (Ribani et al., 2004). Os guias (EURACHEM, 2014) e (INMETRO, 2011) mencionam que as injeções devem ser realizadas de maneira randômicas.

Para qualquer método quantitativo existe uma faixa de concentrações do analito, no qual o método pode ser aplicado. A extremidade inferior da faixa de concentração é limitado pelo LQ e a extremidade superior dependerá do sistema de resposta do equipamento de medição. Durante a validação do método analítico é necessário confirmar que o método pode ser utilizado ao longo deste intervalo (EURACHEM, 2014).

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio, é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito, no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante (INMETRO, 2011).

#### 3.7.1.4 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é vista como uma alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na quantidade mensurada, por exemplo, na concentração do analito. É um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração, conforme a Equação 6, sendo determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

$$S = \frac{dx}{dc} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde: S representa a sensibilidade analítica; dx a variação da resposta; dc a variação da concentração.

#### 3.7.1.5 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas. Mede o erro aleatório ligado ao procedimento analítico, isto é, mede a dispersão dos resultados em torno do seu valor médio (ROZET et al., 2011). É normalmente especificado em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD) também conhecido como coeficiente de variação (CV), que é calculado a partir dos resultados obtidos por meio da realização de medições repetidas, normalmente maior que 20 (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Geralmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2% e métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004).

A replicação é essencial para a obtenção de estimativas confiáveis de características de desempenho do método, tal como precisão. Experimentos envolvendo análise de replicação, devem ser realizados para possibilitar avaliar as variações nas condições operacionais, que podem ser esperados durante o uso rotineiro do método (EURACHEM, 2014).

Para a validação analítica a precisão é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade (INMETRO, 2011).

A repetitividade é uma maneira de medir o grau de concordância dos resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, efetuadas sob as condições de repetitividade. Ou seja, a variabilidade dos resultados obtidos sob as mesmas condições de medição, realizadas pelo mesmo analista, no mesmo local e equipamento e durante um curto espaço de tempo (EURACHEM, 2014).

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída. Recomenda-se sete ou mais repetições para estimar o desvio padrão (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório como, análises realizadas em diferentes dias, por diferentes analistas, em diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é, o de verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004). Para determinar a precisão intermediária recomenda-se que as análises sejam realizadas, no mínimo, em dois dias diferentes. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar (ANVISA, 2012).

A reprodutibilidade, é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição (mudança de operador, local, equipamento, etc). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como, a

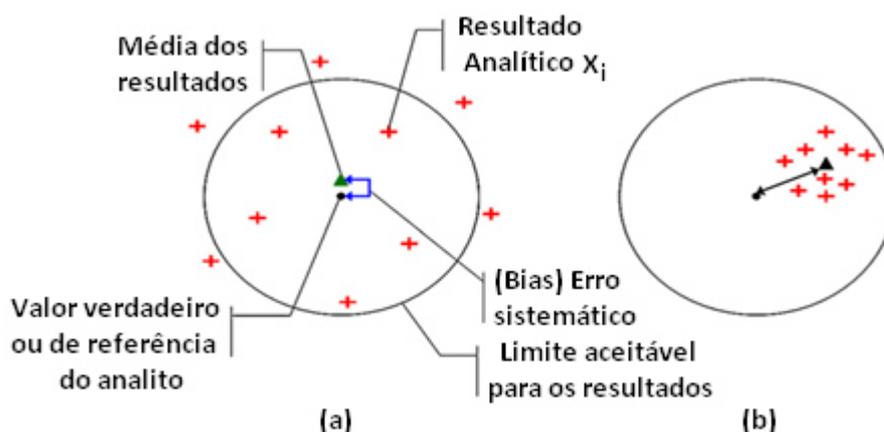
padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX, etc (ANVISA, 2010).

### 3.7.1.6 Exatidão

A exatidão do método é definida como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como, convencionalmente, verdadeiro (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites e, a um dado nível de confiança. Esses limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. A definição de exatidão, algumas vezes, confunde-se com o conceito de precisão, mas isto deve ser evitado. É essencial distinguir a diferença entre um resultado e o valor médio, onde esse, concede a localização central da distribuição dos resultados e, não a posição de cada resultado individual. Por definição, a recuperação, irá fornecer o centro da distribuição dos resultados produzidos pelo método analítico, em relação ao valor verdadeiro aceito (ROZET et al., 2011). (FIGURA 11).

Figura 11 - Ilustração de erros sistemáticos (a) situação de pequeno erro sistemático com resultados fora da meta (b) situação de erro sistemático maior com resultados dentro da meta



Fonte: Adaptado de Rozet et al., 2011.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros, uso de materiais de referência certificados (CRM), participação em comparações interlaboratoriais e, realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

Os CRM são acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância e, uma incerteza associada. Os CRM são fornecidos por organizações reconhecidas e confiáveis, como NIST (National Institute of Standards and Technology - USA), LGC (Laboratory of the Government Chemist - UK), USP, FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme - UK), etc. Os valores obtidos pelo

laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) da mesma amostra padrão, devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método (RIBANI et al., 2004).

O uso correto dos CRM consiste, na análise do mesmo, para avaliar o desempenho do laboratório. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da região de aceitação para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e eliminá-las (INMETRO, 2011).

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como, a quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.

O analito deve ser adicionado a amostra em pelo menos três níveis diferentes de concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, à concentração máxima permissível e, em uma concentração, próxima à média da faixa de uso do método. Para análises de resíduos, o GARP, recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de, 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação. Para componentes em maiores concentrações, os níveis de adição podem ser 50, 75, 100, 125 e 150% do nível esperado para a substância (RIBANI et al., 2004).

A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está, necessariamente, na mesma forma que o presente na amostra (INMETRO, 2007). Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que, proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações otimistas da recuperação. Pelo fato, de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados (RIBANI et al., 2004).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Entretanto, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (RIBANI et al., 2004).

#### 3.7.1.7 Robustez

A robustez de um procedimento analítico mede a sensibilidade que esse apresenta face a pequenas variações. Um método é considerado robusto se, revelar ser, praticamente insensível quando submetido a pequenos desvios em seus parâmetros, no momento de sua execução (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O teste de robustez envolve fazer mudanças no método e verificar o efeito sobre o desempenho do mesmo. É possível identificar as variáveis analíticas que exibem um efeito mais significativo na eficácia do método e, assim, garantir que essas sejam estritamente controladas. As mudanças introduzidas, em um teste de robustez, refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos. (EURACHEM, 2014).

Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em  $\pm 2\%$ , o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em  $\pm 5$  °C. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI et al., 2004).

### 3.8 Ecotoxicologia

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut. Segundo esse autor, a ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem em um contexto integrado (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Na década de 80, as agências ambientais no mundo todo, principalmente nos EUA e na Europa, começaram a desenvolver protocolos padronizados de testes de toxicidade utilizando organismos aquáticos. O chamado “Clean Water Act” foi uma espécie de marco regulatório que deu a USEPA a autoridade para implantar programas de controle da poluição, incluindo padrões de qualidade de efluentes industriais, assim como, requerimentos para a implementação de padrões de qualidade da água para todos os contaminantes de águas superficiais (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Em 1984, a USEPA estabeleceu o uso de organismos para fins de monitoramento da qualidade da água, o chamado monitoramento biológico ou, simplesmente, biomonitoramento. Ao mesmo tempo, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), na Europa, lançava uma série de protocolos de testes com organismos aquáticos como, algas, microcrustáceos e peixes, OECD Guidelines 201, 202, 203, respectivamente (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para monitoramento e avaliação da qualidade da água surgiram no Brasil a partir de 1975, onde foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, utilizando alguns grupos e espécies de organismos aquáticos (SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013).

É recomendável que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, de preferência pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (COSTA et al., 2008).

Os principais representantes do primeiro nível trófico da cadeia alimentar são as algas verdes unicelulares de água doce, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. Os crustáceos de água doce, da ordem Cladocera e do gênero *Daphnia* representam alguns dos organismos do segundo nível trófico e, os principais organismos que representam o terceiro nível trófico são os peixes. No Brasil, a espécie de peixe mais utilizada em testes de toxicidade é o *Danio rerio*, o qual é vulgarmente conhecido como peixe paulistinha ou peixe zebra. A espécie *Pimephales promelas*, também é empregada (COSTA et al., 2008).

#### 3.8.1 O ambiente aquático

O ambiente aquático é altamente complexo e diverso, compreende vários tipos de ecossistemas dentre os quais encontram-se, rios, lagos, estuários, mares e oceanos. Todos esses ecossistemas são produtos dinâmicos de interações complexas entre os componentes bióticos e abióticos, característicos de cada um deles.

Estes ambientes estão vulneráveis a sofrerem contaminação por substâncias químicas. Esta vulnerabilidade dependerá das características dos compostos químicos como, as propriedades físico-químicas, os produtos resultantes da degradação; a concentração dos contaminantes no ecossistema; a duração e o tipo de descarga dos contaminantes (pontuais ou difusas), entre outras (SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013).

Devido à complexidade do ambiente aquático e ao grande número de processos aos quais está sujeito um contaminante neste ambiente, é difícil extrapolar para escala ambiental, as informações provenientes dos testes de toxicidade realizados em laboratório. Além disso, é preciso considerar que, a princípio, devido às diversas condições abióticas e bióticas presentes nos ecossistemas aquáticos, não há nenhum organismo nem comunidade ecológica, que possam ser usados para avaliar todos os efeitos possíveis sobre esses ecossistemas. Contudo, os testes de toxicidade realizados sob condições controladas e padronizadas, vêm servindo como fonte de informações para avaliar os

efeitos ecológicos de contaminantes tóxicos (RONCO et al., 2004<sup>12</sup> apud COSTA et al., 2008).

### 3.8.2 Testes de toxicidade com organismos aquáticos

O efeito tóxico é uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e, também, do tempo de exposição (COSTA et al., 2008).

Tradicionalmente, os testes de toxicidade aquática são utilizados para medir os efeitos tóxicos de substâncias particulares e de águas contaminadas. Os testes com substâncias específicas são realizados com o propósito de obter informações para registros químicos, enquanto que, os testes com águas contaminadas são utilizados para verificar se há concordância dos valores obtidos com os padrões permitidos. Os dados de toxicidade são utilizados para comparar diferentes substâncias químicas, além de permitir comparar a sensibilidade de diferentes organismos aquáticos a uma mesma substância (COSTA et al., 2008).

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos bioindicadores que, por apresentarem pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas, sofrem alguma alteração, fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Esses testes apresentam uma série de normas e procedimentos padronizados. Tais como, as normas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (Tabela 6), que devem ser seguidos para que as respostas obtidas nos testes sejam consideradas válidas.

Os organismos bioindicadores são expostos a diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado de tempo. Esta exposição pode ser aguda ou crônica (SÄMY; TORRENS; MEDEIROS, 2010).

A exposição é dita aguda quando, a concentração letal do agente tóxico a que o organismo é exposto, é liberada em um único evento e rapidamente absorvida. Os efeitos adversos dessa exposição manifestam-se em curto espaço de tempo, geralmente de 24 a 48 h, não superior a um terço do tempo médio necessário para o nascimento e, a

---

<sup>12</sup> RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. In: MORALES, G. C. ed. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, In tercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Ottawa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004, cap. 1.

maturação sexual do indivíduo. Preveem respostas individuais como, letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede, por exemplo, o estado de imobilidade. Os testes de toxicidade aguda permitem que valores de concentração efetiva média,  $CE_{50}$ , e concentração letal média,  $CL_{50}$ , sejam determinados por métodos estatísticos computacionais como o Probit, Logit, e os métodos Spearman-Karber e trimmed Spearman-Karber.5 (COSTA et al., 2008).

No ambiente aquático, os efeitos agudos provocados por agentes tóxicos nos organismos podem resultar de aplicações inadequadas de pesticidas, de acidentes ambientais e efluentes industriais não tratados que são lançados nos corpos d'água receptores (COSTA et al., 2008).

Tabela 6 - Normas padronizadas da CETESB e ABNT

	Normas	Identificação
	L.5.018	Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (Cladocera, Crustacea)
	L.5.019	Teste de toxicidade aguda com peixes, Parte I – Sistema Estático, Parte II – Sistema Semi-Estático, Parte III – Sistema de fluxo contínuo
Normas da CETESB	L.5.020	Teste de toxicidade com <i>Chorella vulgaris</i> (Chlorophyceae)
	L.5.022	Avaliação de toxicidade crônica, utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea)
	NBR 12713	Água – Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (Cladocera, Crustacea)
	NBR 12714	Água – Ensaio de toxicidade aguda com peixes – parte I – Sistema estático
Normas da ABNT	NBR 12715	Água – Ensaio de toxicidade aguda com peixes – parte II - Sistema semi-estático
	NBR 12716	Água – Ensaio de toxicidade aguda com peixes – parte III – Sistema de fluxo contínuo

Fonte: Magalhães; Ferrão-Filho, 2008.

A exposição é classificada como crônica quando, o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos e durante um longo período de tempo que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste. Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas, sob condições de exposições prolongadas, a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como, reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (COSTA et al., 2008).

Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como, concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado

(CEO), mas também podem ser expressos como  $CE_{50}$  (concentração efetiva média) (COSTA et al., 2008).

Em princípio, qualquer espécie aquática pode ser utilizada em testes de toxicidade como um organismo bioindicador. Entretanto, as espécies utilizadas nesses testes devem apresentar algumas características, como, seletividade constante e elevada aos contaminantes, elevada disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, ampla distribuição e importância comercial e, facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. (COSTA et al., 2008).

As espécies do gênero *Daphnia* (Claus, 1876), também conhecidas como pulgas-d'água, são uma importante fonte de alimento para peixes. Tem aproximadamente 0,5 a 5,0 mm de comprimento. A reprodução é partenogenética, dando origem a populações constituídas inteiramente por fêmeas e, caso ocorra um estresse ambiental, surgem na cultura machos, que fecundando as fêmeas dão origem a ovos denominados efípios. Devido a elevada sensibilidade desses organismos a poluentes e a facilidade de manutenção do cultivo em laboratório, são considerados organismos ideais para utilização em testes de toxicidade (SÄMY; TORRENS; MEDEIROS, 2010).

A *Pseudokirchneriella subcapitata* é uma alga verde unicelular, distribuída em água doce, amplamente empregada em estudos de contaminação de origem agrícola. Sua utilização é frequentemente recomendada por protocolos nacionais e internacionais, para realização de estudos de ecotoxicidade, pois exibem rápido crescimento e suas culturas são facilmente preparadas em laboratórios (COSTA et al., 2008; JONSSON; AOYAMA, 2009).

Nakagome; Noldin; Resgalla (2006), determinaram a  $CE_{50}$ ; 48h de alguns herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado com base na toxicidade dos compostos para *Daphnia magna*. Foram avaliados os herbicidas oxyfluorfem, oxadiazona, carbofentazona etílica, clomazona, quincloraque, pirazossulfurom etílico, 2,4-D, bispiribaque-sódico, metsulfurom metílico, bentazona e os inseticidas lambdacialotrina, fipronil e carbofurano. Os resultados indicaram que os herbicidas oxyfluorfem, oxadiazona e, os inseticidas lambdacialotrina, fipronil e carbofurano foram os produtos com maior toxicidade sobre *D. magna*.

Jonsson; Maia (2007), avaliaram o efeito adverso de amostras de lodo, oriundas das estações de tratamento de efluentes das cidades de Franca (SP) e Barueri (SP), sobre o microcrustáceo de água doce *Daphnia similis*. Os resultados indicaram que o uso dos

dois lodos testados para fins agrícolas, nas taxas de aplicação agrônômica recomendadas ou superiores a essas, constitui algum risco para os sistemas aquáticos adjacentes.

Prestes; Jonsson; Castro (2011), estudaram efeito toxicológico (inibição de crescimento) de formulações fungicidas à base de piraclostrobin e epoxiconazol, isoladamente e em formulação conjugada, sobre a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Os resultados deste mostraram que piraclostrobin apresentou menor toxicidade às algas em relação aos dados encontrados na literatura, o epoxiconazol resultados semelhantes aos descritos na literatura e, a mistura dos compostos apresentam elevada toxicidade.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Análises Ecotoxicológicas

#### 4.1.1 Ensaio toxicidade aguda com microcrustáceo *Daphnia Similis claus*

O ensaio de toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia Similis* foi realizado conforme a Norma NBR 12713/04. Este método consiste na exposição de organismos jovens do gênero *Daphnia* a várias diluições da amostra por um período de 48 h.

Neonatos com 6 a 24h de vida foram expostos a diferentes concentrações dos I.A. glifosato e bentazona, como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Cada concentração foi avaliada em quadruplicata, sendo que, ao controle foi adicionado somente água de cultivo da *D. similis*.

Os testes foram realizados em quatro replicatas, em recipientes com capacidade de 30,00 mL e o volume final de amostra foi de 20,00 mL. Em cada recipiente foi adicionado o I.A. avaliado, água de cultivo e 5 organismos distribuídos aleatoriamente. Os recipientes foram mantidos em câmaras incubadoras com fotoperíodo, sem alimentação, com temperatura variando entre  $20 \pm 2$  °C. Decorrido o período de exposição, que foi de 48h, realizou-se a contagem dos organismos imóveis. Foram considerados imóveis aqueles que não apresentaram movimento dentro de um intervalo de 15 segundos após uma leve agitação do recipiente. A  $CE_{50}$  foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber. Os resultados foram expressos em  $mg L^{-1}$  e, considerados válidos se, no término do período de ensaio, a porcentagem dos organismos imóveis no controle não exceder 10%.

Tabela 7 - Concentrações de glifosato utilizado no teste de toxicidade aguda

Concentração Glifosato ( $mg L^{-1}$ )	Volume solução de Glifosato (mL)	Volume água de cultivo (mL)	Volume final (mL)
Controle	-----	20	20
0,500	1,7	18,3	20
2,000	6,7	13,3	20
4,400	14,7	5,3	20
5,000	16,7	3,3	20
6,000	20	-----	20

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 8 - Concentrações de bentazona utilizado no teste de toxicidade aguda

Concentração Bentazona (mg L <sup>-1</sup> )	Volume solução de Bentazona (mL)	Volume água de cultivo (mL)	Volume final (mL)
Controle	-----	20	20
0,050	1	19	20
0,100	2	18	20
0,200	4	16	20
0,300	6	14	20
0,400	8	12	20

Fonte: Arquivo Próprio.

Anteriormente a realização dos testes para avaliar a toxicidade aguda, os organismos foram cultivados em lotes de até 25 adultos por litro, em recipientes de 1 a 2 L, com luminosidade difusa, fotoperíodo de 16h de luz e temperatura de 20 °C ± 2 °C. Os cultivos foram trocados no mínimo duas vezes por semana e as *D.similis* organismos eram descartados quando atingiam idade superior a 28 dias.

A alga verde unicelular, *P. subcaptata* foi utilizada para alimentação da *D. similis*. Além da alga, também foi fornecido um complemento alimentar à base de ração de peixe fermentada. Esta alimentação ocorreu diariamente.

Para avaliar se os cultivos encontravam-se aptos para a realização dos testes foi realizado o ensaio de sensibilidade com as *D.similis* utilizando uma solução de cloreto de sódio (NaCl), conforme descrito nos procedimentos da NBR 12713/04. As concentrações-teste (1,6; 2,0; 2,3; 2,6; e 3,0 g L<sup>-1</sup>) foram preparadas em água de cultivo partindo de uma solução estoque de NaCl 6,00 g L<sup>-1</sup> em água destilada.

Foram consideradas viáveis para utilização em testes de toxicidade os organismos que apresentaram valores de CE<sub>50</sub> 48h dentro da faixa de sensibilidade estabelecida pelo laboratório. A CE<sub>50</sub> – 48h foi calculada pelo método Trimmed Spearman-Kärber e os resultados expressos em mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2 Ensaio de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcaptata*

O método para determinação da toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcaptata* foi realizado conforme a metodologia NBR 12648/05. Este método consiste na exposição de organismos-teste a várias diluições da amostra, por um período de 72 a 96 h. O efeito tóxico é determinado pela inibição do crescimento da biomassa algácea nos recipientes-teste comparado com o controle.

O inóculo algal utilizado no ensaio foi preparado, inoculando – se 100,00 µL da cultura algácea em 100,00 mL do meio de cultivo L.C.Oligo, previamente autoclavado (120 °C por 15”). O inóculo algal foi iniciado com 6 dias de antecedência ao ensaio e foi mantido incubado no shaker, temperatura  $25 \pm 2$  °C, intensidade luminosa 3500 Lux e agitação de 130 rpm. No dia do ensaio, o inóculo, em fase exponencial de crescimento, foi utilizado para inocular as soluções-teste, de forma que a concentração inicial de algas estivesse entre  $10^4$  –  $10^5$  células/mL no volume final de 20,00 mL.

A cultura foi exposta a cinco diferentes concentrações dos I.A avaliados. O volume das soluções-teste, do meio de cultivo, da água destilada e das concentrações avaliadas adicionadas aos erlenmeyers encontram-se nas Tabelas 9 e 10. O procedimento foi realizado em triplicata, duração de 96 h, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, intensidade luminosa 3500 Lux e agitação de 130 rpm. Foram utilizados frascos erlenmeyers de 100,00 mL e o volume final de solução-teste foi de 20,00 mL.

O número de células algáceas foi determinado através do método de contagem celular em câmara de Neubauer. Tanto a preparação dos inóculos como a montagem do teste ocorreram na câmara de fluxo laminar para evitar contaminações. Os recipientes-teste foram dispostos aleatoriamente no shaker e suas posições foram alteradas diariamente, diminuindo assim, possíveis interferências espaço-temporais.

A biomassa algácea foi determinada nos controles no início do ensaio e em todos os recipientes-teste no final do ensaio. As biomassas médias produzidas em 96 h foram obtidas através da subtração das biomassas finais pelas iniciais.

*Tabela 9 - Modo de preparo do teste de toxicidade crônica utilizando bentazona*

<b>Concentração Bentazona (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vol. solução Bentazona (mL)</b>	<b>Vol. meio de cultivo (mL)</b>	<b>Vol. Algal (µL)</b>	<b>Vol. de água (mL)</b>	<b>Vol. Final (mL)</b>
Controle	-----	2,4	60	17,54	20
0,150	3	2,4	60	14,54	20
0,300	6	2,4	60	11,54	20
0,500	10	2,4	60	7,54	20
0,700	14	2,4	60	3,54	20
1,000	20	2,4	60	-----	20

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 10 - Modo de preparo do teste de toxicidade crônica utilizando glifosato

Concentração Glifosato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Vol. solução Glifosato (mL)	Vol. meio de cultivo (mL)	Vol. Algal ( $\mu\text{L}$ )	Vol. de água (mL)	Vol. Final (mL)
Controle	-----	2,4	60	17,40	20
3,500	11,7	2,4	60	5,70	20
4,000	13,5	2,4	60	3,90	20
4,500	15	2,4	60	2,40	20
5,000	16,7	2,4	60	0,70	20
5,500	18,5	2,4	60	-----	20

Fonte: Arquivo próprio.

A avaliação da sensibilidade da cultura algácea de *P. subcaptata* foi realizada com sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), de acordo com os procedimentos descritos na NBR 12648/95. As concentrações-teste (0,03; 0,06; 0,12; 0,25; e 0,50  $\text{mg L}^{-1}$ ) foram preparadas com água processada a partir de uma solução-estoque  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1  $\text{g L}^{-1}$ . O ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio com os herbicidas. Os resultados foram expressos em Concentração de Inibição (Cip) à 50% dos organismos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e calculados conforme o programa ICP (The Inhibition Concentration Program) versão 2.0. Foram consideradas adequadas para utilização nos testes de toxicidade as culturas que apresentaram (Cip) à 50% dentro da faixa de sensibilidade estabelecida pelo laboratório.

A toxicidade aguda e crônica foi estudada com os compostos orgânicos, bentazona e glifosato e, também, com amostra de água do Rio Canas.

#### 4.2 Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas

Para a análise de risco de contaminação de águas superficiais foi utilizado o método de Goss. Esse reúne um conjunto de critérios (Tabela 5), em que é considerada a meia vida do herbicida no solo ( $t_{1/2 \text{ solo}}$ ), o coeficiente de adsorção ao carbono orgânico ( $K_{oc}$ ) e a solubilidade do herbicida em água ( $S_w$ ). Assim, os I.A foram classificados quanto ao seu potencial de transporte associado ao sedimento ou dissolvido em água.

Na análise de risco de contaminação de águas subterrâneas foi aplicado o índice GUS e o método de screening EPA. O índice GUS, foi calculado aplicando a Equação 1. O resultado desse cálculo indicou qual categoria (não sofre lixiviação; faixa de transição; tendência à lixiviação) os I.A, bentazona e glifosato, pertencem. O método de screening EPA envolveu analisar as propriedades dos I.A, de acordo com alguns critérios, conforme mencionado no item 3.6.2 deste estudo. Foram considerados contaminantes em potencial aqueles I.A para os quais a maioria das propriedades físico-químicas disponíveis, indicaram uma possibilidade de contaminação de águas subterrâneas.

### 4.3 Estudo das condições cromatográficas e Extração em fase sólida para determinação do herbicida bentazona

Visando a determinação do herbicida em água a metodologia analítica foi desenvolvida e validada empregando a cromatografia líquida de fase reversa. Foi utilizado o cromatografo líquido de alta eficiência da Metrohm®, equipado com o módulo 850 Professional IC, 858 Injetor Professional Sample Processor, 887 Detector Professional UV-VIS. Uma coluna Prontosil 120-5-C18 AQ – 150/4.0, substrato sílica gel C-18, porosidade de 5 µm foi utilizada neste método.

#### 4.3.1 Preparo das soluções

A solução estoque de bentazona foi preparada em metanol (MEOH) PA – 99,9% na concentração de 1000,00 mg L<sup>-1</sup>. A partir desta, soluções de trabalho nas concentrações de 100,00 e 10,00 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas, estocadas em frascos âmbar e reservadas a temperatura de 4°C na ausência de luz.

No método para detecção e quantificação de bentazona foi empregado um gradiente de eluição, composto por duas fases móvel constituída por (MEOH) PA – 99,9% e água milli-q nas proporções 35:65 e 90:10. O pH destas soluções foi ajustado em 2.4, utilizando ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (PINTO; JARDIM, 1999; ZANELLA et al., 2003).

Todas as soluções utilizadas no desenvolvimento deste estudo foram filtradas em membrana de vidro com porosidade 1.2 e 0.45 µm e, as soluções de fases móvel foram degaseificadas utilizando o equipamento de ultrason.

#### 4.3.2 Seleção do comprimento de onda da Bentazona

Foi realizado um estudo a fim de avaliar o comprimento de onda em que a bentazona apresenta maior absorvidade. Para tanto estudou-se o comprimento de onda na faixa UV-VIS, utilizando padrão de bentazona, 1,00 mg L<sup>-1</sup>. Foi empregado um espectrofotômetro, marca FEMTO; modelo 800 XL.

#### 4.3.3 Coleta e Preservação das amostras

As amostras de água foram coletadas semanalmente durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015, no Rio Canas, localizado no município de Canas/SP. Este rio após atravessar o município, contorna extensas áreas de cultivo de arroz localizadas na Rua do Meio (Figura 12), mantendo-as inundadas, com lâmina d'água de aproximadamente 15 cm, continuamente ao longo do ciclo do arroz. Desta maneira, a captação da água para o alagamento das quadras de arroz e sua posterior drenagem ocorrem diretamente no Rio Canas.

Foram realizadas duas coletas por semana, totalizando dezesseis amostras durante estes três meses. A coleta e preservação das amostras foram realizadas seguindo o guia nacional de coleta e preservação de amostras, publicado pela Agência Nacional de Águas (ANA), em conjunto com a CETESB (AGÊNCIA..., 2011).

Figura 12 - Principais cultivos de arroz irrigado localizados no município de Canas



Fonte: Google Earth

Em campo, a amostragem foi realizada com precaução e técnica para evitar todas as fontes possíveis de contaminação, retardar a ação biológica e a alteração do composto químico. No momento da coleta os frascos âmbar, previamente limpos, foram ambientados tomando-se o cuidado de que, no momento da coleta, partículas e detritos não fossem acidentalmente armazenados junto às amostras. Os frascos âmbar contendo as amostras foram transportados em bolsas térmicas, previamente refrigeradas. Realizada a coleta, as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz solar e mantidas refrigeradas a 4°C.

#### 4.3.4 Preparo da amostra e Procedimento de extração em fase sólida (SPE)

As amostras, uma vez coletadas e corretamente armazenadas no laboratório foram processadas em um intervalo de 24 a 36 horas, garantindo a manutenção de suas características físicas e químicas. Inicialmente foi realizado a filtração da amostra com membrana de vidro de porosidade 1,20 e 0,45 µm. Em seguida, o pH das amostras foi ajustado a 2,00, empregando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Neste ponto as amostras encontravam-se prontas para o procedimento de SPE.

A SPE foi realizada conforme Jardim et al. (1999) e Zanella et al. (2003) com algumas modificações/adaptações, visando a otimização do método. Neste procedimento

foi utilizado cartucho de extração EuroAnalytical LTDA, fase C18 sílica octadecila, 500 mg de sorvente, capacidade para 3 mL e, um manifold vac elut da Agilent Technologies®.

Primeiramente, foi realizado o condicionamento do cartucho de extração passando 10,00 mL de metanol e 10,00 mL de água mili-q, pH 2,00, previamente acidificado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Em seguida, foi realizada a percolação da amostra, 1,00 L, através do cartucho com o auxílio de uma bomba de vácuo, controlando a vazão (3 mL Min<sup>-1</sup>). Após a percolação de todo o volume de amostra, foi realizada a etapa de clean up passando pelo cartucho 5,00 mL de água mili-q. O eluato foi descartado, secou-se o leito sorvente com a passagem de ar por 5 a 10 minutos. O analito foi eluído (ação da gravidade) com 1,00 mL de metanol. O eluato foi evaporado utilizando nitrogênio gasoso. Finalmente, o resíduo foi ressuscitado em 1,00 mL de água mili-q e, injetado no cromatógrafo.

#### 4.4 Validação do método desenvolvido para determinação do herbicida bentazona em água

A validação do método desenvolvido para determinação da bentazona em água foi realizada seguindo alguns guias dentre estes, o Guia EURACHEM, INMETRO, ANVISA, IUPAC e, referências literárias, Zanella et al. (2003), Pinto et al. (1999), Green et al. (1996) e Ribani et al. (2004).

Uma vez estabelecido, as condições operacionais do método analítico, foi realizado o procedimento de validação onde foi verificado as seguintes figuras de mérito: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, sensibilidade analítica, precisão, exatidão, e robustez. Com os parâmetros de validação e critérios de aceitação definidos, foi realizado o planejamento experimental da validação seguido de sua execução.

Após a validação do método, esse foi aplicado para detectar e quantificar bentazona em amostras de água do Rio Canas próximo ao deságue das culturas de arroz irrigado.

##### 4.4.1 Limite de detecção e Limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados pelo método da relação sinal-ruído (S/R), onde foi realizado a comparação entre, a medição dos sinais obtidos referente as concentrações conhecidas de bentazona em água deionizada e, um branco analítico. A relação sinal-ruído, geralmente aceitas, como estimativas para LD e LQ são de 3:1 e 10:1, respectivamente. Abaixo destes níveis a detecção e quantificação do analito torna-se problemática e imprecisa.

Primeiramente foi realizada a injeção, em triplicata, do padrão de bentazona, concentração de 1,00 mg L<sup>-1</sup>, para analisar qual seria a relação S/R. Após o tempo de corrida da amostra a relação S/R foi verificada e, a partir desta, injeções de amostras nas

concentrações de 0,14; 0,12; 0,11 e 0,08 mg L<sup>-1</sup> de bentazona foram realizadas, em triplicata e, os LD e LQ determinados.

#### 4.4.2 Linearidade e Efeito Matriz

Para avaliação da linearidade as curvas analíticas foram preparadas de maneira independente, com solução padrão em diferentes níveis de concentração, igualmente espaçados (0,12 a 6,00 ppm). O ponto zero (branco da curva analítica) foi utilizado como ferramenta de controle de qualidade e para ajustar o “zero instrumental”.

As curvas analíticas foram preparadas em triplicata, em balões volumétricos de 10,00 mL, adicionando o padrão bentazona em água deionizada de acordo com a concentração referente a cada nível pré-determinado. As injeções das amostras foram realizadas aleatoriamente no sentido de evitar o comportamento de tendência.

No estudo para avaliação do efeito matriz, curvas analíticas foram preparadas em água do Rio Canas e água de uma nascente localizada no município de Piquete/SP. Foi utilizado os mesmos níveis de concentração, espaçamento e, condições mencionadas acima. As inclinações das três curvas analíticas foram comparadas para avaliação de possíveis interferentes.

Uma vez definida a faixa linear, ao longo de todas as análises cromatográficas da validação analítica, assim como, da aplicação do método validado foram construídas curvas analíticas acatando todos os pontos da linearidade.

#### 4.4.3 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, logo pode ser determinada simultaneamente com os testes de linearidade, sendo expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração, conforme Equação 6.

#### 4.4.4 Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, em três níveis de concentração diferentes, 1, 2 e 10 vezes o LQ, estimado anteriormente. O padrão de bentazona foi adicionado a 250,00 mL água deionizada, pH 2, nas concentrações 0,12; 0,24 e 1,20 mg L<sup>-1</sup>. O procedimento foi realizado em 7 replicatas para cada nível, totalizando 21 determinações. As replicatas foram filtradas em membranas de vidro, 1.2 e 0.45 µm, seguido pelo procedimento de SPE, já descrito anteriormente (item 4.3.4).

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica, conforme Equação 7.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Seguindo os guias de validação analítica, ANVISA, 2010; INMETRO, 2011; ICH, 2001, os intervalos geralmente aceitáveis de recuperação para análise de resíduos estão entre 90 e 110%, com precisão de até  $\pm 10\%$ .

#### 4.4.5 Precisão

A precisão foi estudada considerando dois níveis, a repetitividade/repetibilidade e a reprodutibilidade, que são precisão intra-corrída e a inter-corrída, respectivamente.

Os ensaios de repetitividade foram realizados em 3 níveis de concentração, adicionando o padrão a 250,00 mL de água deionizada, pH 2, nos níveis de concentração 1; 2 e 10 vezes o LQ. Foram realizadas 7 repetições para cada nível, totalizando 21 determinações. As repetições ocorreram em um curto espaço de tempo, no mesmo local, com mesmo analista e pelo mesmo procedimento.

A reprodutibilidade interna foi realizada seguindo o ensaio de repetitividade, adicionando a variante tempo, onde os níveis de concentração de bentazona, 0,12; 0,24 e 1,20 mg L<sup>-1</sup> foram preparados e, analisados em 3 dias diferentes.

Nos ensaios para avaliar a precisão foram realizados os procedimentos de preparo da amostra e de SPE, conforme já descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.4.

A precisão foi expressa por meio da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou seja, pelo coeficiente de variação (CV), conforme Equação 8, onde:  $s$  é o desvio padrão absoluto;  $\bar{x}$  a média aritmética do número de medições.

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

O RSD geralmente aceitável, depende dos níveis de concentração da amostra. Quando se quantifica substâncias em macro quantidades, é requerido um RSD variando de 1 a 2 % e, em determinação de análises traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%. Porém, é sabido que quanto menor for o RSD mais criterioso e preciso será o método analítico (RIBANI et al., 2004). Neste estudo trabalhou-se com CV de até  $\pm 10\%$ .

#### 4.4.6 Robustez

Para avaliar a robustez do método alguns parâmetros analíticos foram selecionados para sofrerem pequenas variações, como, a proporção da composição da fase móvel, o pH da fase móvel e a temperatura da coluna.

No método desenvolvido é utilizado um gradiente composto pelas fases móvel A e B (MEOH : H<sub>2</sub>O), nas proporções 35:65 e 90:10, respectivamente, pH 2.4 e, coluna Prontosil C18 na temperatura de 45 °C. Com a finalidade de observar quais seriam, os efeitos ocasionados em decorrência a alteração na proporção da composição da fase móvel, no pH das fases e na temperatura da coluna, foram realizados os seguintes experimentos em triplicata:

- A fase móvel (MEOH : H<sub>2</sub>O) foi avaliada nas proporções 30:70 / 85:15 e 40:60 / 95:5;
- pH 2.3 e 2.5;
- Temperatura da coluna 42 e 48 °C.

O preparo das amostras e o procedimento de SPE (itens 4.3.1 e 4.3.4) foi realizado previamente as injeções das mesmas no equipamento. Nesta etapa trabalhou-se com bentazona na concentração 1,00 mg L<sup>-1</sup>, em 250,00 mL de água deionizada.

## 5 Resultados e Discussão

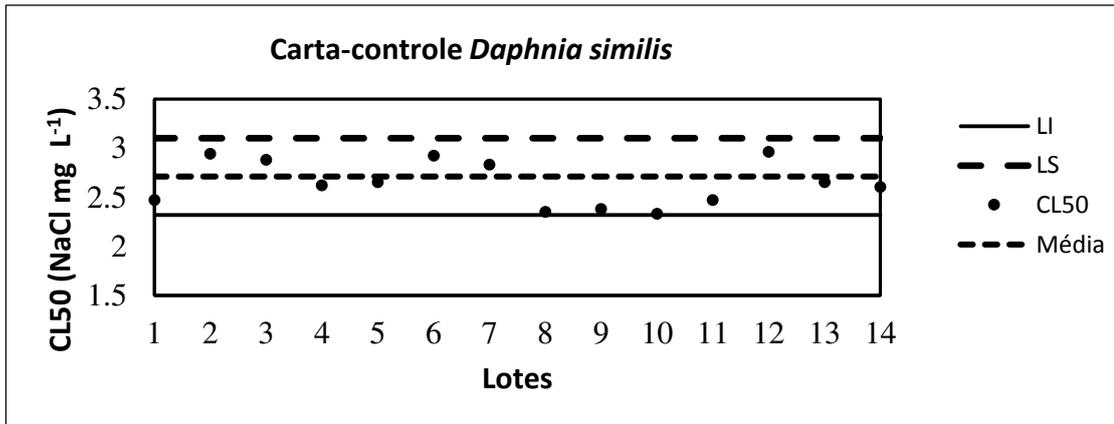
### 5.1 Toxicidade aguda e crônica utilizando *D. similis* e *P. subcaptata*

#### 5.1.1 Avaliação da sensibilidade dos organismos-teste

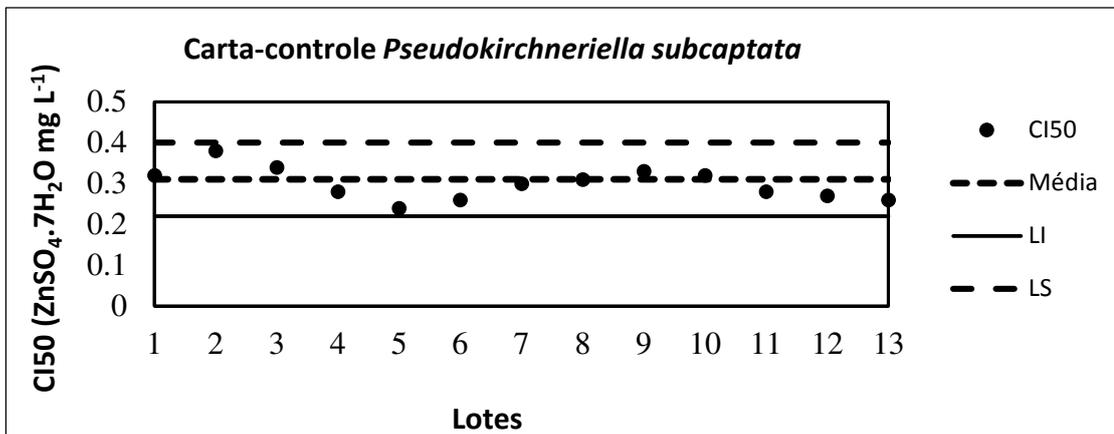
Testes de toxicidade com invertebrados aquáticos fornecem um importante suporte na determinação de impactos que podem ser causados ao meio ambiente, principalmente devido a elevada sensibilidade apresentada por estes organismos nas fases iniciais de desenvolvimento.

A sensibilidade do organismo teste deve ser avaliada mensalmente por meio de ensaio com substância de referência. Neste sentido, os testes para avaliar a sensibilidade do microcrustáceo *D. similis* e da alga *P. subcaptata* foram realizados, previamente, à avaliação da toxicidade aguda e crônica. Foi empregado como substância de referência NaCl e ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O para *D. similis* e *P. subcaptata*, respectivamente. Os resultados obtidos foram expressos em carta-controle (Figuras 13 e 14), que é uma ferramenta de registro que contempla as respostas dos ensaios de sensibilidade realizados.

Analisando as cartas-controle, primeiramente *D. similis* (Figura 13), observa-se que a média da CE<sub>50 - 24h</sub> encontrada para exposição a NaCl foi de 2,71 mg L<sup>-1</sup> e, o intervalo no qual os microcrustáceos estão aptos para uso é de 2,32 e 3,10 mg L<sup>-1</sup> (limites inferior e superior). Na avaliação da sensibilidade das culturas algais *P. subcaptata* (Figura 14), os resultados foram expressos em concentração de inibição à 50 % dos organismos, empregando o programa computacional ICP. A média de CI<sub>50 - 96h</sub> encontrada para exposição a ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foi de 0,31 mg L<sup>-1</sup> e, os limites inferior e superior foram de 0,22 e 0,40 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A sensibilidade dos organismos-teste avaliados encontraram-se dentro dos limites estipulados, indicando que estão aptos a serem empregados nos testes de toxicidade aguda e crônica, conferindo precisão e confiabilidade aos resultados a serem obtidos.

Figura 13 - Carta-controle *Daphnia similis*

Fonte: Arquivo próprio.

Figura 14 - Carta-controle *P. subcaptata*

Fonte: Arquivo próprio.

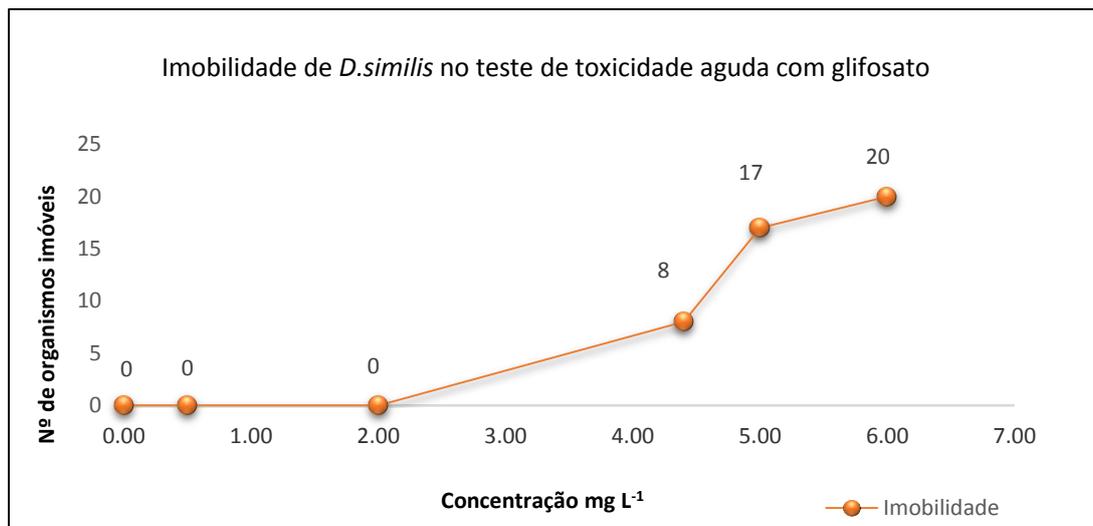
### 5.1.2 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda dos I.A foi avaliada seguindo a NBR 12713/05 utilizando o microcrustáceo *D. similis*.

A toxicidade aguda do glifosato foi avaliada após exposição do microcrustáceo a diversas concentrações deste I.A (Tabela 7). Observou-se que o herbicida apresentou significativa toxicidade, imobilidade, em concentrações superiores a 4,40 mg L<sup>-1</sup>, conforme Figura 15.

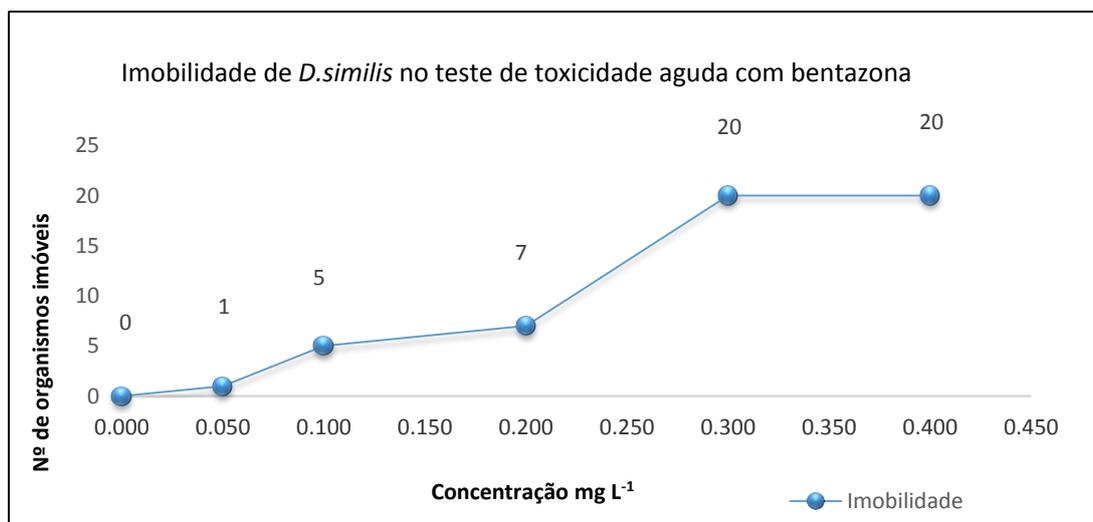
Empregando o método Trimmed Spearman–Karber (COSTA et al., 2008) a CE<sub>50</sub> calculada para glifosato neste estudo foi de 4,56 mg L<sup>-1</sup>. Consta na ficha de informação de segurança do produto formulado Roundup® que a toxicidade aguda a microcrustáceos é igual a 11,00 mg L<sup>-1</sup> (MONSANTO, 2014). Segundo a EGEIS, European Glyphosate Environmental Information Source, 2015, a CE<sub>50</sub> do Roundup® para invertebrados varia entre 3 a 7,40 mg L<sup>-1</sup>.

Figura 15 – Resultado do teste de toxicidade aguda com glifosato



Fonte: Arquivo próprio.

Figura 16 – Resultado do teste de toxicidade aguda com bentazona



Fonte: Arquivo próprio.

A toxicidade aguda do I.A bentazona presente no produto formulado Basagran®, foi estudada e, ao longo dos procedimentos observou-se que este I.A, ocasionou 100% de imobilidade a *D. similis* quando expostas a concentrações superiores a 0,300 mg L<sup>-1</sup>, conforme relatado na Figura 16.

Empregando o método Spearman-Kärber, calculou-se a CE<sub>50</sub> obtendo um valor de 2,72 mg L<sup>-1</sup>. Este valor é significativamente menor que encontrado na ficha de segurança ecotoxicológica emitida pela BASF para o Basagran®, onde a CE<sub>50</sub> informada para invertebrados é de 125,00 mg L<sup>-1</sup>, para o produto formulado (THE CHEMICAL COMPANY, 2011). Esta diferença observada entre as CE<sub>50</sub>, pode ser em razão da interação do I.A. com outros componentes adicionados ao produto final, por exemplo, tenso ativo.

Nakagome; Noldin; Resgalla (2006), determinaram a  $CE_{50}$  - 48h de alguns herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado, com base na toxicidade dos compostos para *Daphnia magna*. O bentazona estava entre os herbicidas estudados. Esse apresentou  $CE_{50}$  - 48h igual a 3,90 mg L<sup>-1</sup>.

#### 5.1.3 Toxicidade Crônica

A toxicidade crônica do glifosato e bentazona a alga *P.subcaptata* foi avaliada conforme a NBR 12648/05. Foi determinada após decorrido o tempo de exposição, 96 h, da alga *P.subcaptata* a cinco diferentes concentrações dos I.A. O efeito tóxico foi determinado observando se houve inibição do crescimento da biomassa algácea nos recipientes-teste comparando-os ao controle.

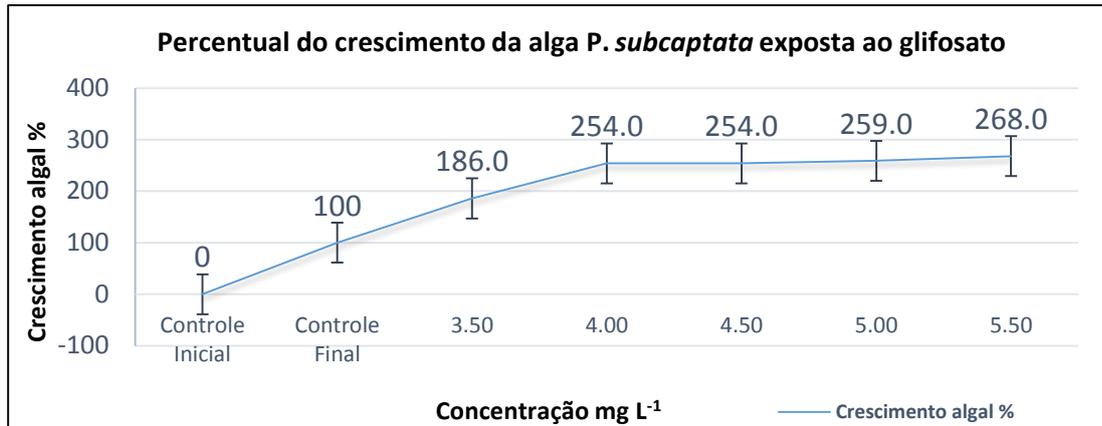
Ao analisar os resultados de exposição da alga ao glifosato (Figura 17) observou-se que não houve inibição do crescimento algal, ao contrário do esperado, ocorreu um aumento da biomassa produzida nos recipientes que continham glifosato em relação ao controle. O percentual de aumento variou entre 186 a 268 %.

Analisando a densidade de células algais que foram produzidas sob exposição das cinco concentrações de glifosato estudadas, constatou-se que no controle final haviam  $1,76 \times 10^6$  células algais e, no recipientes-teste, onde continha glifosato em maior concentração,  $5,500 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $4,72 \times 10^6$  células.

Alguns estudos realizados por Lancaster et al. (2010), Sumalan et al. (2008), Zabaloy et al. (2008), mostram que o glifosato pode ser utilizado por organismos presente no ambiente como fonte de nutriente, uma vez que ao ser biodegradado disponibiliza moléculas para o meio que podem ser assimiladas como fonte nutricional. Esses estudos relatam um aumento na população de organismos presente no solo, quando expostos a diferentes concentrações de glifosato (PARTOAZAR; HOODAJI; TAHMOURESPOUR, 2011).

A biodegradação da molécula de glifosato e, conseqüente, disponibilidade de P, N e C podem ter contribuído para o crescimento algáceo observado no presente estudo. Extrapolando estes resultados para o ambiente aquático, a disponibilidade destes elementos pode ocasionar um desequilíbrio na cadeia trófica, pois assim como a alga *P.subcaptata*, outros organismos fitoplânctons podem assimilar esses compostos, favorecendo a expansão e, conseqüentemente, intensificando alguns processos biológicos, por exemplo a eutrofização.

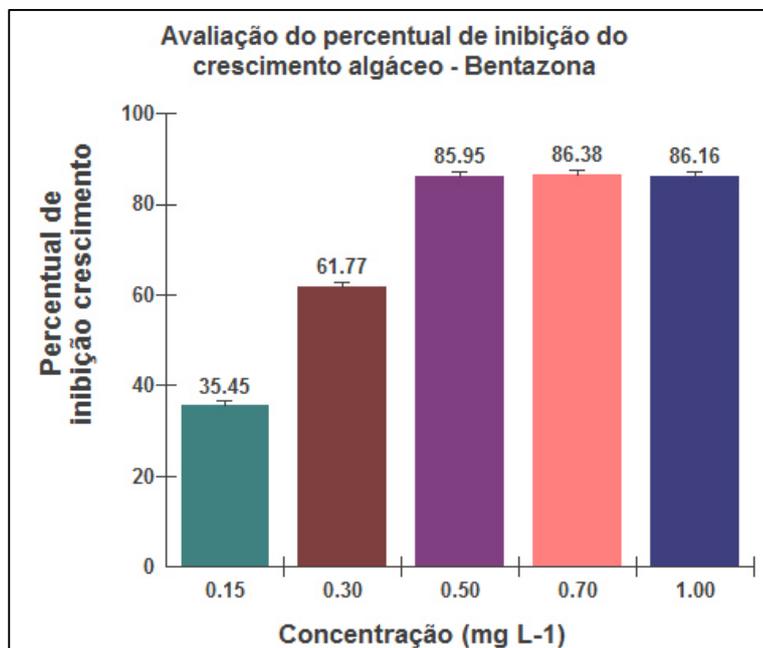
Figura 17 – Resultado do teste de toxicidade crônica com glifosato



Fonte: Arquivo próprio.

Analisando os resultados de exposição da alga ao bentazona, observou-se que houve inibição do crescimento algáceo em todas as concentrações estudadas, conforme relatado na Figura 18. O maior percentual de inibição (86%) foi obtido em três das cinco concentrações testadas neste estudo.

Figura 18 - Resultado do teste de toxicidade crônica com bentazona



Fonte: Arquivo próprio.

A inibição do crescimento algáceo observada deve-se ao fato de que o bentazona atua como um inibidor da fotossíntese, bloqueando a transferência de elétrons do PS II para o PSI e, conseqüente, fixação de CO<sub>2</sub>. Este bloqueio fotossintético que a bentazona ocasiona em algas na presença de luz, induz efeitos secundários em algumas vias

metabólicas, que levam a síntese de espécies reativas de oxigênio, ocasionando danos oxidativos irreparáveis (GALHANO et al., 2011).

Os pesticidas deixam resíduos na água da cultura de arroz que ao serem drenada das quadras e liberadas no Rio Canas, podem estar submetendo as espécies aquáticas a toxicidade destes compostos. Contudo, os efeitos letais, em geral, são raros de serem observados, devido ao fato dos organismos estarem expostos à baixas concentrações dos pesticidas, normalmente concentrações subletais, caracterizando os efeitos crônicos.

A legislação que disciplina os níveis de contaminação de água varia entre as agências ambientais internacionais. A Comunidade Econômica Européia estabeleceu em  $0,10 \text{ mg L}^{-1}$  a concentração máxima admissível de qualquer pesticida e em  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  a soma total de resíduos (COPATTI; GARCIA; BALDISSEROTTO, 2009).

O Brasil, no entanto, ainda carece de uma legislação mais eficiente sobre limites de concentração máxima na água para a maioria dos pesticidas atualmente utilizados. Segundo as portarias MS nº 518/2004 e 2.914/11 os VMP para glifosato e bentazona em água é de  $0,500$  e  $0,300 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente (COPATTI; GARCIA; BALDISSEROTTO, 2009). Correlacionando estes valores com os resultados de toxicidade aguda e crônica obtidos neste estudo, é possível inferir, que estes I.A nas concentrações permitidas pela legislação, podem vir ocasionar efeitos tóxicos ao ambiente aquático.

Testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados com amostra de água coletada no Rio Canas durante o mês de dezembro/2015. Os resultados não demonstraram efeitos tóxicos. Contudo, havia chovido durante as duas semanas de dezembro em que ocorreram as coletas. Essa adversidade pode ter influenciado nos resultados obtidos, pois as chuvas, dependendo de sua intensidade e frequência, interferem no transporte e na perda dos pesticidas no ambiente, além de diminuir a concentração dos I.A na água.

Algumas alternativas podem minimizar o impacto dos pesticidas no ambiente aquático, por exemplo, recomenda-se sempre a utilização de doses mínimas na aplicação do pesticida, propiciando uma redução de 30-50% em relação à dose máxima, podendo chegar a 85% no caso do glifosato. Sugere-se manter estática a lâmina de água por um período mínimo de duas semanas após a aplicação do pesticida, proporcionando uma redução de contaminação de até 97% do composto químico aplicado. Com estas alternativas, a água a ser liberada para rios e lagos apresentará uma quantidade significativamente menor de pesticidas, reduzindo o impacto ao ambiente (COPATTI; GARCIA; BALDISSEROTTO, 2009).

## 5.2 Análise de risco de contaminação ambiental teórica

Por definição “risco” é a combinação da probabilidade da ocorrência de um evento perigoso e a gravidade dos danos que podem ser ocasionados à saúde e ao ambiente. Deste modo, o risco de contaminação ambiental é caracterizado como a probabilidade de um ecossistema sofrer danos, em decorrência da exposição a algumas situações, por exemplo, poluição química e contaminação radioativa, que acaba sendo refletido em diferentes escalas organizacionais (CHEN; CHEN; FATH, 2013).

Na análise de risco de contaminação de águas superficiais foi empregado o método de Goss que classifica os pesticidas em alto, médio ou baixo potencial de contaminação, associado ao sedimento ou dissolvido em água, de acordo com suas características físico-químicas. As características e propriedades dos I.A, bentazona e glifosato (Tabela 11), foram obtidas no Pesticides Properties Database (PPDB) e na literatura (ANDRADE et al., 2011; PRIMEL et al., 2005; SCORZA, 2006).

Tabela 11 - Propriedades físico-químicas dos ingredientes ativos bentazona e glifosato

I.A	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Kow	PV (mPa)	pKa (25°C)	t <sub>1/2</sub> solo (d)	t <sub>1/2</sub> água (d)	Koc (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	K <sub>H</sub> (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
<b>Bentazona</b>	570	0,347	0,17	3,2-3,3	21-45	80	52	7.20E-05
<b>Glifosato</b>	10.500	6.31E-04	1,31E-02	2,34	12	30	24.000	2.10E-07

I.A = Ingrediente ativo; Kow = coeficiente de partição octanol-água; PV = pressão de vapor; pKa = constante de acidez em escala logarítmica; t<sub>1/2</sub> solo = tempo meia vida no solo; t<sub>1/2</sub> água = tempo de meia vida na água; Koc = constante de adsorção ao carbono orgânico; K<sub>H</sub> = constante de Henry. Fonte: Arquivo próprio.

Seguindo o método de Goss e as propriedades físico-químicas da bentazona, observa-se que esse I.A pode ser classificado como baixo potencial de transporte associado ao sedimento (BPTAS) e, como médio potencial de transporte dissolvido em água (MPTDA). O glifosato de acordo com suas propriedades é classificado como médio potencial de transporte associado ao sedimento (MPTAS) e, dissolvido em água (MPTDA). Estes resultados condizem com os obtidos por Andrade et al. (2011), Martini et al. (2012) e Menezes; Heller (2011).

O método de GUS e o screening EPA foram aplicados com a finalidade de analisar o risco de contaminação de águas subterrâneas (SPADOTTO, 2002). O índice GUS obtido para bentazona e glifosato foi de 3,45 e – 0,41, respectivamente. Estes valores classificam a bentazona na categoria de provável lixiviação (GUS ≥ 2,8) e, o glifosato na categoria de pesticidas que não sofrem lixiviação (GUS ≤ 1,8).

Scorza (2006), relata um índice GUS de 3,21 para bentazona e, – 0,63 para glifosato classificando-os na mesma categoria obtida neste estudo. No estudo desenvolvido por

Martini et al. (2012) o bentazona e o glifosato foram classificados nas categorias de faixa de transição ( $1,8 < \text{GUS} < 2,8$ ) e não sofre lixiviação ( $\text{GUS} \leq 1,8$ ), respectivamente. Essas diferenças observadas na classificação dos pesticidas em uma determinada categoria, ocorrem devido a utilização de dados físicos e químicos retirados de banco de dados distintos.

Pelo método de screening EPA, a bentazona é classificado como contaminante em potencial e, o glifosato como contaminante parcialmente positivo de águas subterrâneas, conforme estudo realizado por Mesquita Brito et al. (2001). No estudo desenvolvido por Martini et al. (2012), o glifosato e o bentazona são classificados como potencial contaminante de águas subterrâneas.

Existe na literatura outros métodos como, o Fator de atenuação (AF) e de retardamento (RF) e o Potencial de temperatura de lixiviação (TLPI), que podem ser aplicados para avaliar o risco potencial de contaminação ambiental. Porém, é relatado que a principal limitação de aplicação destes métodos é a ausência e a diversidade de dados, de características físico e químicas dos pesticidas (ANDRADE et al., 2011).

Os modelos desenvolvidos para estimar o risco de contaminação ambiental não refletem exatamente a realidade, pois diferentes locais apresentam variações no tipo do solo, clima, cultura e outros fatores que, em muitos casos, não são considerados nestes modelos. Contudo, são vistos como ferramentas valiosas para avaliações simplificadas do comportamento dos pesticidas no ambiente (RIBEIRO et al., 2007).

É interessante ressaltar que os critérios aqui avaliados dizem respeito ao comportamento do pesticida no ambiente. Outros parâmetros, no entanto, precisam ser considerados, entre os quais: condições de aplicação, índice pluviométrico, características do solo e temperatura. Estes parâmetros podem concorrer com as propriedades físico e químicas para aumentar o potencial inerente ao pesticida, acarretando contaminação das águas subterrâneas ou superficiais (MESQUITA BRITO et al., 2001).

Analisando os resultados ecotoxicológicos e a avaliação de risco de contaminação de águas, obtidos neste estudo para os I.A. Juntamente a informações presente na literatura como, a elevada capacidade de adsorção do glifosato ao solo, sua rápida degradação formando a metabolito AMPA. Optou-se em desenvolver um método analítico para determinação de bentazona em água. Pois as informações citadas acima, sugerem que o glifosato fica fortemente adsorvido ao solo, permanecendo como um resíduo ligado ao sedimento até sua completa mineralização, que pode durar dias ou meses, dependendo das características do solo (MORAES; ROSSI, 2010).

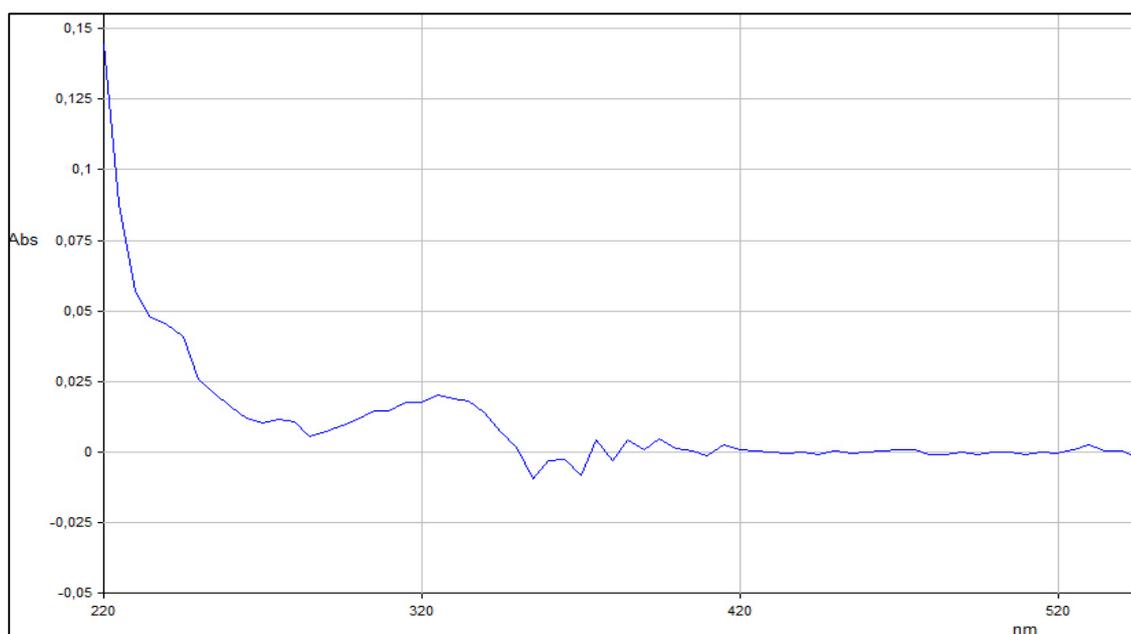
### 5.3 Validação do método cromatográfico desenvolvido

O método desenvolvido para determinação cromatográfica de bentazona em água foi validado seguindo alguns guias específicos para validação de métodos analíticos como, o guia ANVISA (2010), INMETRO (2011), guia harmonizado pela IUPAC (2002) e o EURACHEM (2014), e algumas referências literárias, dentre as principais, Green et al. (1996), Pinto et al. (1999), Zanella et al. (2003) e Ribani et al. (2004).

Na literatura é mencionado alguns comprimentos de onda ( $\lambda$ ) em que o bentazona apresenta absorvidade, 220; 230 e 250 nm (PINTO; JARDIM, 1999; ZANELLA et al., 2003). Após verificar a absorvidade do composto nos  $\lambda$  da região UV-VIS, selecionou-se o  $\lambda$  referente a 230 nm para o desenvolvimento do método para determinação de bentazona em água, conforme Pinto et al. (1999). Uma vez que o detector UV-VIS é sensível a concentração do analito presente na amostra, a resposta detectada será proporcional a concentração de bentazona contida no meio. Assim, selecionando o  $\lambda$  de 230 nm aumenta-se a sensibilidade do método desenvolvido, pois a molécula de bentazona apresenta maior absorvidade molecular neste  $\lambda$ .

O metanol apresenta absorvidade no  $\lambda$  de 220 nm (Figura 19), assim este  $\lambda$  não poderia ser selecionado, uma vez que o metanol é componente das fases móvel utilizadas no gradiente de eluição do método desenvolvido, podendo ocasionar um viés na resposta a ser mensurada.

Figura 19 - Espectro referente a absorbância do bentazona, 1,00 mg L<sup>-1</sup>, na região do UV-VIS



Fonte: Arquivo próprio

Para o bom desenvolvimento de um procedimento de validação é preciso assegurar que, todo o sistema selecionado para o processo de análise, está apto a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Esta é a etapa inicial a ser estabelecida e é obtida, para os métodos cromatográficos, a partir de testes experimentais de conformidade do sistema (system suitability), que inclui a avaliação dos seguintes parâmetros: fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), resolução ( $R_s$ ), número de pratos ( $N$ ) e fator de assimetria ( $A_s$ ) (RIBANI et al., 2004).

A adequação do sistema foi avaliada durante a análise cromatográfica e os parâmetros observados foram  $N$ ,  $A_s$ ,  $K$  e a repetitividade avaliando o RSD. Realizou-se injeção do padrão, 1,00 mg L<sup>-1</sup>, respeitando um tempo de análise de 50 minutos.

De acordo com o recomendado pelo guia de orientação para procedimentos analíticos e métodos de validação, United States Food and Drug Administration (US-FDA) (2000,) Ribani et al. (2004) e Naves et al. (2014), o  $N$  em geral, deve ser  $> 2000$ ; o  $k > 2$ ; o  $A_s$  deve estar entre 0,95 e 1,15 e o RSD  $< 1\%$  para  $n > 5$ . Os valores obtidos para os parâmetros avaliados encontraram-se dentro das especificações supracitadas e, o RSD obtido para  $n = 6$  foi de 0,2 %.

#### 5.3.1 Faixa Linear e Efeito de Matriz

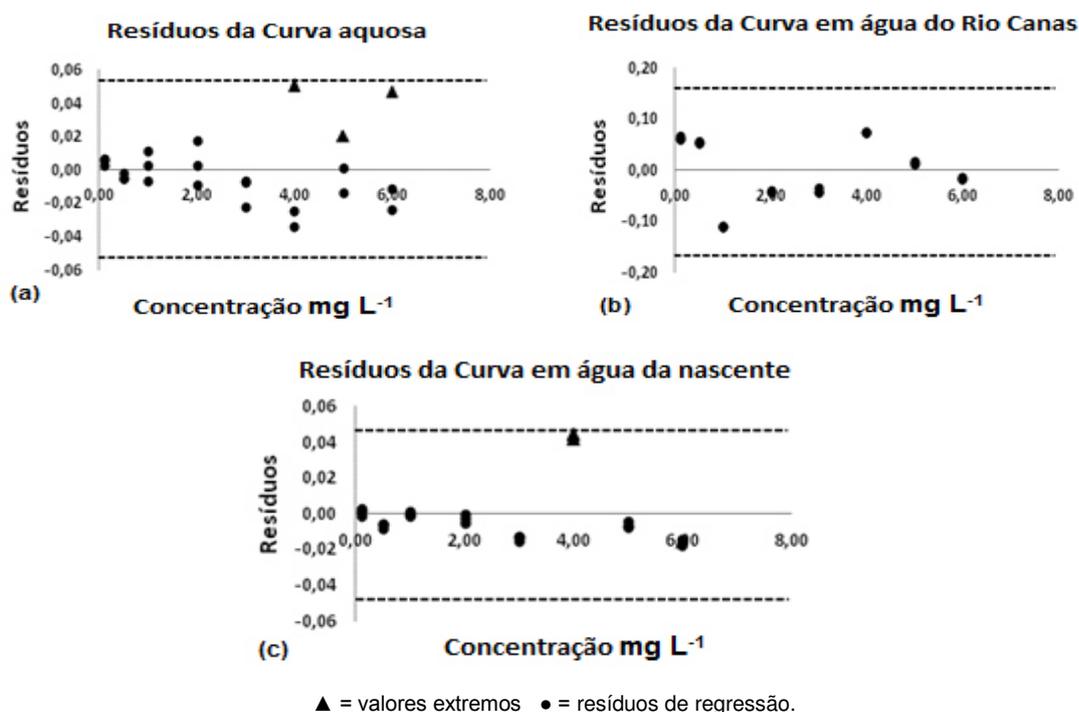
O primeiro parâmetro avaliado na validação analítica foi a faixa linear. Essa foi estudada por meio da estimativa dos parâmetros pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), inspeção visual dos dados e tratamento de valores discrepantes. O MMQO parte da premissa que os resultados seguem a distribuição normal, têm variância constante ao longo do eixo  $x$  e, são independentes. Assim, estas premissas devem ser constatadas verdadeiras nos dados trabalhados (BOMFIM; ABRANTES; ZAMITH, 2010).

Foram construídos e analisados gráficos de resíduos da regressão para verificar a presença de valores extremos, denominados de *outliers*, que são os pontos fora do intervalo  $\pm t(1-\alpha/2; n-2)S_{res}$ , sendo  $S_{res}$  o desvio padrão dos resíduos da regressão (BOMFIM; ABRANTES; ZAMITH, 2010). Como o MMQO é muito sensível à presença de *outliers*, esses foram identificados e tratados aplicando o teste de resíduos padronizados de Jackknife (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou, até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (PINHEIRO et al., 2010).

Na Figura 20 estão representados os gráficos exploratórios dos resíduos de regressão (resíduos da regressão versus níveis de concentração) de bentazona avaliados em três meios: branco analítico, água do Rio Canas e água da nascente. As linhas em

pontilhado nestes gráficos correspondem a  $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{res}$ , que é o intervalo de variação aceitável para os resíduos de regressão representados nos gráficos. Os perfis destes gráficos de resíduos mostram que não houve tendências visuais que demonstrassem heteroscedasticidade ou desvio de linearidade.

Figura 20 - Gráfico dos resíduos de regressão para bentazona nos três meios estudados



Fonte: Arquivo próprio.

Os intervalos de confiança dos resíduos  $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{res}$ , observados na Figura 20, sugerem a presença de três *outlier* em, 4,00; 5,00 e 6,00 mg L<sup>-1</sup>, na curva analítica em meio a água mili-q. Na curva analítica em meio à água da nascente observou-se comportamento similar, com três valores extremos em 4,00 mg L<sup>-1</sup>. Já na curva analítica em meio a água do Rio Canas não foi observado qualquer *outlier*. Estes valores extremos indicados no formato de triângulo, foram removidos após aplicação do teste de resíduos padronizados de Jackknife, respeitando um limite de 22,2% do número original dos dados (n = 24), conforme Pinheiro et al. (2010).

A avaliação de valores extremos é uma etapa muito importante no processo de validação de um método analítico, pois permite a eliminação de valores discrepantes frente ao conjunto de dados, que podem influenciar na equação da regressão, tornando o modelo não representativo. A análise gráfica dos resíduos de regressão, dá uma indicação inicial de que os mesmos parecem distribuir-se aleatoriamente em torno da reta, com dispersão constante, sugerindo que não há violação dos pressupostos de homoscedasticidade, média nula e independência.

Realizada a avaliação e tratamento dos *outliers*, as premissas exigidas pelo MMQO, a normalidade (pelo teste de Ryan-Joiner), a homoscedasticidade das variâncias dos resíduos (pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe) e a independência dos resíduos da regressão (pelo teste de Durbin & Watson) foram avaliadas. O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio de linearidade avaliado contra o erro puro (BOMFIM; ABRANTES; ZAMITH, 2010). Os resultados constam na Tabela 12.

O teste de Ryan-Joiner avalia a correlação entre os resíduos de regressão para cada curva e os valores normais teoricamente esperados. É um teste similar ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando a correlação é próxima a 1, assume-se que os dados possuem distribuição normal e, quando o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ( $R_{eq}$ ) é menor que o valor crítico apropriado ( $R_{crit}$ ), rejeita-se a hipótese nula de normalidade.

De acordo com este teste ( $\alpha = 0,01$ ), obteve-se um  $R_{eq} > R_{crit} = 0,932$  para as curvas em meio à água mili-q e água da nascente e  $R_{eq} > R_{crit} = 0,939$  para a curva em meio à água do Rio Canas (Tabela 12). Estes valores indicam que há uma correlação significativa entre os resíduos de regressão nos três meios avaliados. Assim, pode-se dizer que não há desvio da normalidade para as três curvas (REIS et al., 2015; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Tabela 12 - Resultados das análises estatísticas aplicadas para verificar a normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos de regressão

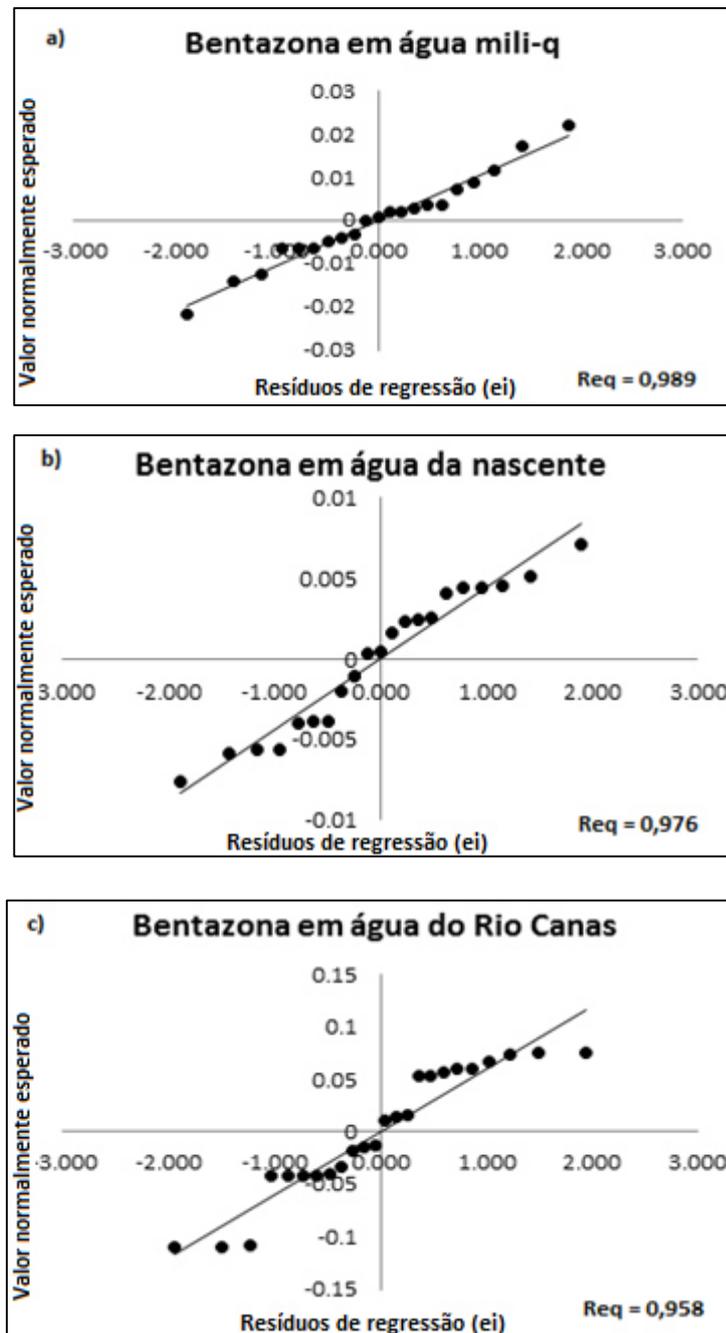
<b>Parâmetros</b> <b>Curvas</b>	<b>Água Mili-q</b>	<b>Rio Canas</b>	<b>Nascente</b>
$R_{eq}$ para Normalidade	0,989	0,958	0,976
d para Independência	1,91	0,586	1,37
$t_L / T_{critic}$ for Homoscedasticidade	1,38 / 0,185	3,86 / $8,54 \times 10^{-4}$	2,02 / 0,574
F para significância da Regressão	$1,42 \times 10^6$	$5,20 \times 10^4$	$9,17 \times 10^6$

$R_{eq}$  = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner;  $t_L$  = estatística *t* de Levene; d = estatística de Durbin-Watson.

Fonte: Arquivo próprio.

Na Figura 21, estão representados os gráficos da normal QQ dos resíduos de bentazona em água mili-q, água da nascente e em água do Rio Canas, com seus respectivos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner. Pode-se observar que os resíduos de regressão encontram-se centrados na média, apresentando pouco dispersão.

Figura 21 - Gráfico da normal QQ dos resíduos de regressão do bentazona no três meios estudados



Fonte: Arquivo próprio.

A estatística de Durbin-Watson analisa a autocorrelação, a dependência entre os resíduos de regressão. De acordo com esta estatística, os resíduos da regressão não apresentaram autocorrelação ( $D > dU = 1,16$ ) ( $p < 0,01$ ) para as curvas em meio à água mili-q e água da nascente, indicando a independência dos resíduos (Tabela 12). A curva obtida em meio à água do Rio Canas apresentou  $D < dU = 1,20$ , indicando dependência dos resíduos (REIS et al., 2015). Contudo, esse resultado indica apenas que as replicatas foram muito bem reproduzidas apresentando baixo CV, uma vez que são replicatas

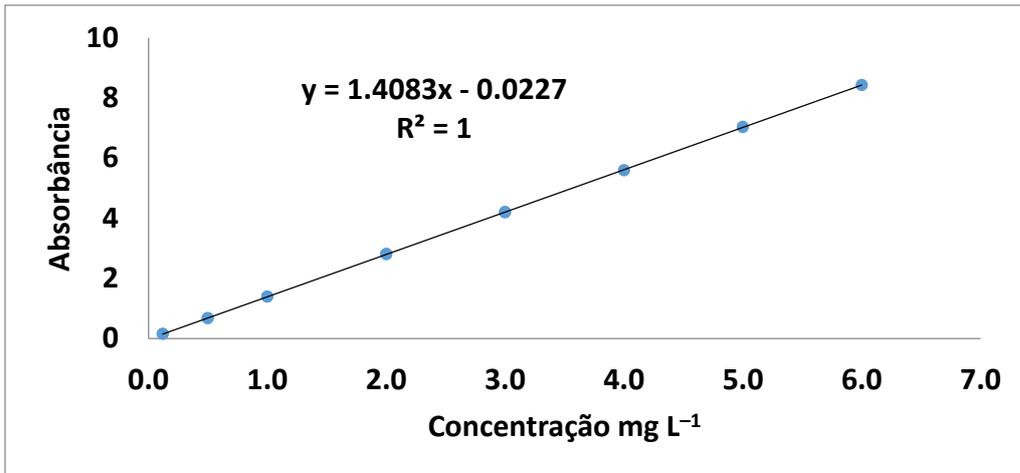
genuínas e as medidas foram realizadas de maneira aleatória, não inviabilizando assim aplicação do MMQO para estimar os parâmetros de regressão.

O Teste de Levene modificado por Brown & Forysthe analisa a igualdade das variâncias das variáveis de interesse para as populações envolvidas (ALMEIDA; ELIAN; NOBRE, 2008). Na avaliação da homoscedasticidade da variância dos resíduos de regressão por meio desse teste (BOMFIM; ABRANTES; ZAMITH, 2010), verificou-se que os resíduos não apresentaram variabilidade significativa para os três meios avaliados ( $t_L > T_{crit}$ ) a um nível de confiança de 95% (Tabela 12). Neste sentido, pode-se inferir que a variabilidade foi constante ao longo das concentrações estudadas, ou seja, confirma-se a homoscedasticidade entre os resíduos de regressão. Este comportamento é também confirmado nos gráficos dos resíduos (Figura 20), onde observa-se a distribuição aleatória dos resíduos em torno da curva (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Após verificadas e confirmadas as premissas do MMQO, obteve-se as seguintes equações de regressão: Área = 1,4083 [Bentazona] – 0,0227 ( $R^2 = 1,000$ ) para a curva em água mili-q, Área = 1,4235 [Bentazona] – 0,0875 ( $R^2 = 0,9996$ ) para a curva em meio a água do Rio Canas e Área = 1,4107 [Bentazona] – 0,0249 ( $R^2 = 1,000$ ) para a curva em meio a água da nascente (Figuras 22 a 24). De acordo com a ANOVA, as regressões para os três meios avaliados foram significativas com  $p < 0,01$  ( $F > F_{crit} = 8,2$  para água mili-q e água da nascente e  $F > F_{crit} = 7,9$  para Rio Canas). Assim, pode-se dizer que o método desenvolvido para determinação de bentazona em água apresenta linearidade ou, faixa linear, compreendida entre 0,12 a 6,00 mg L<sup>-1</sup>. O cromatograma referente à linearidade obtida para bentazona pode ser observado na Figura 25.

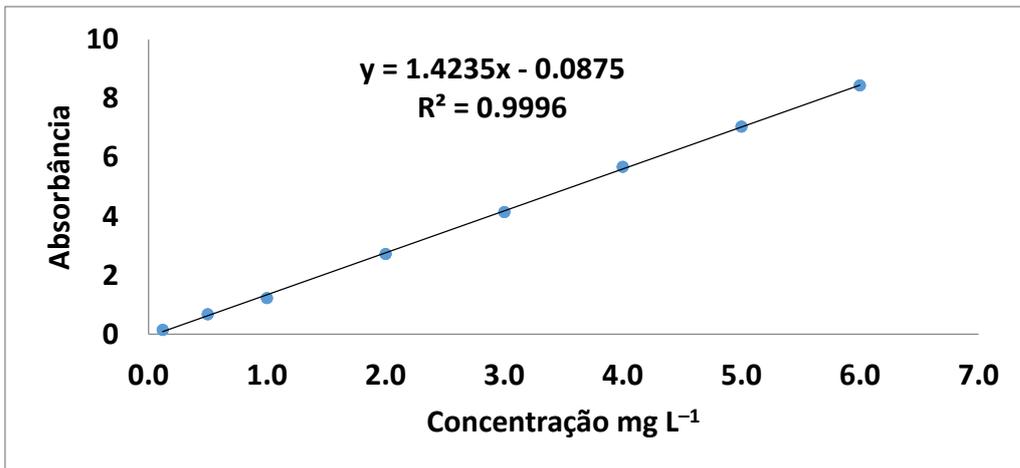
Pode-se observar que não houve diferença significativa entre as inclinações das curva em meio à água mili-q e em meio à água da nascente, indicando a ausência de efeito de matriz. O mesmo comportamento foi observado ao comparar as inclinações da curva em meio à água mili-q e em meio à água do Rio Canas. Entretanto, pode-se observar que as intercessões são diferentes, indicando, possível efeito de matriz (SOUZA et al., 2014).

Figura 22 - Curva analítica para bentazona em água mili-q



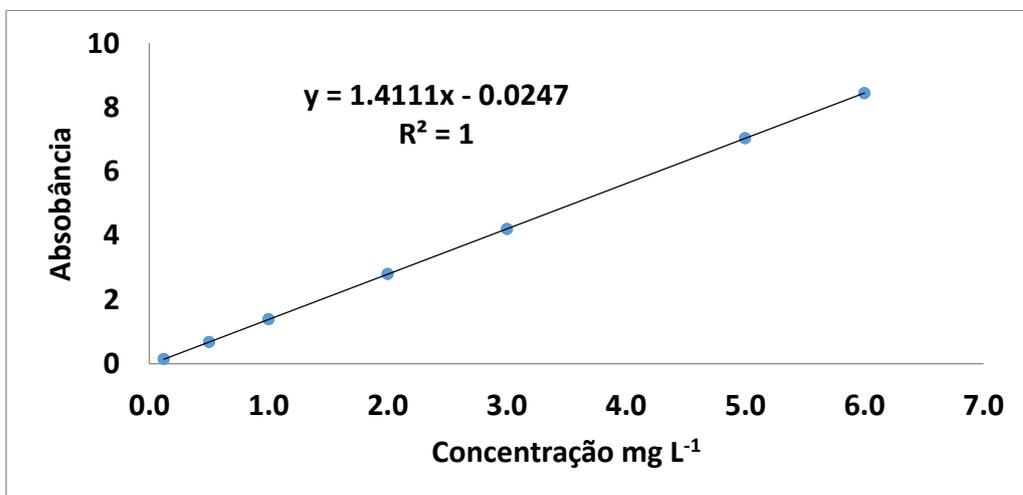
Fonte: Arquivo próprio.

Figura 23 - Curva analítica para bentazona em água do Rio Canas



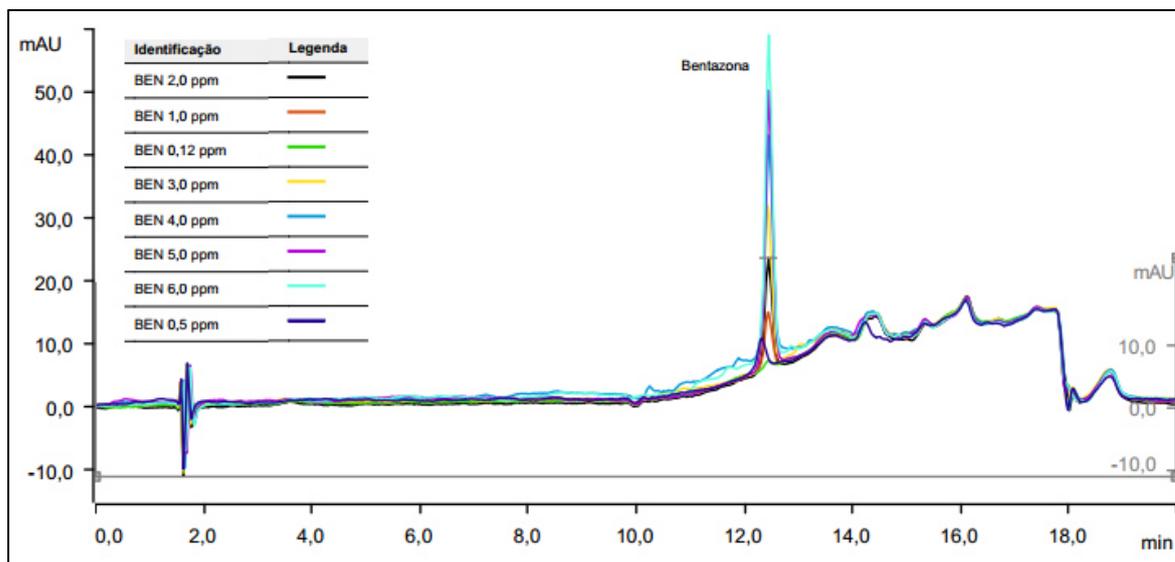
Fonte: Arquivo próprio.

Figura 24 - Curva analítica para bentazona em água da nascente



Fonte: Arquivo próprio

Figura 25 - Cromatograma referente a linearidade obtida para bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1



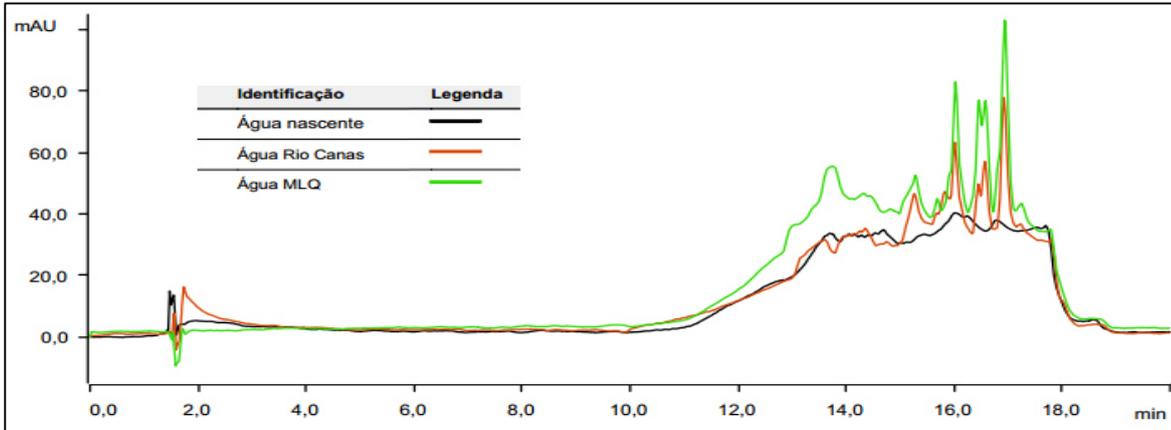
Fonte: Arquivo próprio.

Neste sentido, cromatogramas foram obtidos a partir das injeções, em triplicata, de amostras de água mili-q, do Rio Canas e da nascente fortificadas ( $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) e não fortificadas. Foi possível observar que, nos cromatogramas referente as amostras não fortificadas, não houve nenhum pico de resposta cromatográfica no tempo de retenção ( $t_R$ ) do bentazona (12,45 minutos), não havendo evidências de que interferentes e contaminantes, possam coeluir com o analito no  $t_R$  determinado. Nos cromatogramas referente as amostras fortificadas, observou-se um pico cromatográfico no  $t_R$  de 12,45 minutos, referente a concentração de  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  de bentazona, conforme Figuras 26 a 28.

Comparando as áreas dos picos cromatográficos obtidos, ( $\mu = \text{média} \pm \text{DP} = \text{desvio padrão}$ ,  $n = 3$ ),  $1,034 \pm 0,001$ ;  $1,035 \pm 0,001$  e  $1,034 \pm 0,001$ , em água mili-q, Rio Canas e nascente, respectivamente, observou-se que a pequena diferença verificada nos interceptos das curvas, não proporcionaram erros significativos na determinação do bentazona nos três meios avaliados. Uma vez que, as áreas referente aos picos cromatográficos foram semelhantes, o  $t_R$  do bentazona não sofreu alteração nos meios analisados e, houve adequada precisão ( $\text{CV} < 10\%$ ) e recuperação analítica (100%).

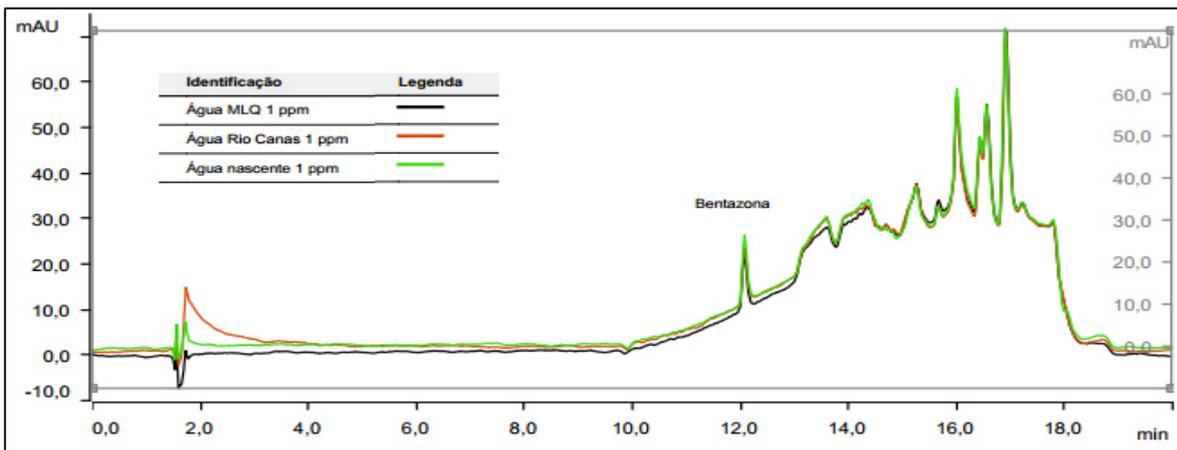
Desta maneira foi certificada a seletividade do método cromatográfico desenvolvido para determinação de bentazona em água, pois a resposta mensurada, pico de resposta, é única e exclusivamente do analito de interesse, bentazona, e não de algum composto químico ou fisicamente semelhante, o que resultaria em um viés na resposta a ser mensurada.

Figura 26 - Cromatograma referente as injeções de água mili-q, do Rio Canas e da nascente não fortificadas com bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1



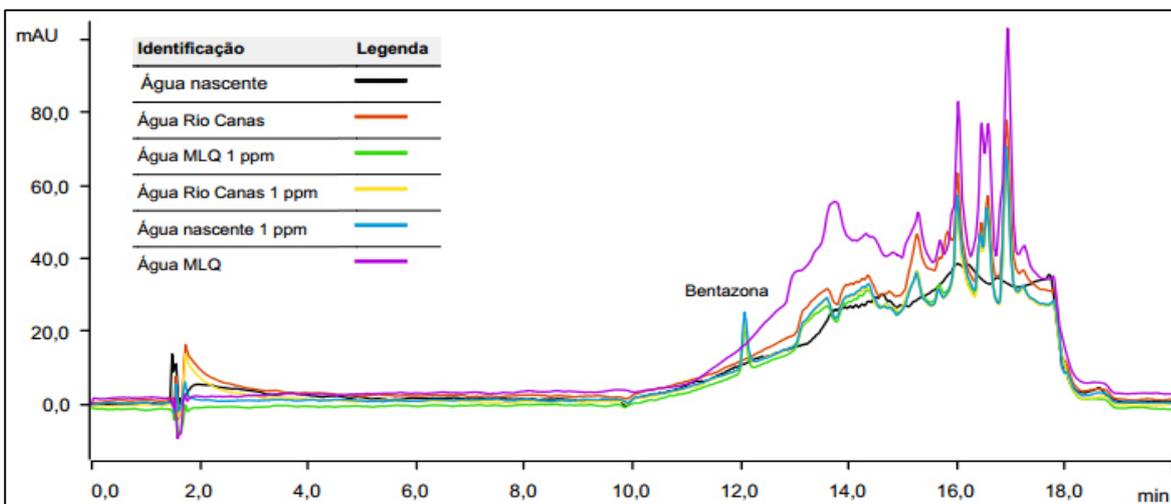
Fonte: Arquivo próprio.

Figura 27 - Cromatograma referente as injeções de água mili-q, do Rio Canas e da nascente, fortificadas na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> de bentazona, com relação sinal/ruído acima de 3:1.



Fonte: Arquivo próprio.

Figura 28 - Cromatograma referente a sobreposição das injeções de bentazona, 1 mg L<sup>-1</sup>, nos três meios analisados, com relação sinal/ruído acima de 3:1



Fonte: Arquivo próprio.

### 5.3.2 Limites de Detecção e Limites de Quantificação

Os Limites de Detecção e os Limites de Quantificação foram estimados a partir das relações sinal/ruído das seguintes concentrações de bentazona: 1,00; 0,14; 0,12; 0,11; 0,08 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Padrões de bentazona foram injetados, em triplicata, no HPLC em ordem decrescente de concentração. Para cada amostra obteve-se um sinal, indicando a área ocupada pelo pico cromatográfico, e um ruído (linha base). Por meio destes, a relação sinal/ruído foi calculada e consta na Tabela 13.

Tabela 13 - Limites de detecção e de quantificação para bentazona

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Sinal ( $\mu$ ) / DP	Ruído ( $\mu$ ) / DP	Relação Sinal-Ruído/DP
1,00	7,483 / 0%	0,108 / 0%	69,29 / 0%
0,14	1,307 / 2%	0,111 / 1%	11,82 / 2%
0,12	0,852 / 1%	0,102 / 1%	8,42 / 1%
0,11	0,636 / 1%	0,104 / 1%	6,17 / 1%
0,08	0,338 / 1%	0,110 / 1%	3,07 / 2%

$\mu$  = média da triplicada; DP = desvio padrão

Fonte: Arquivo próprio.

As proporções sinal-ruído geralmente aceitas na validação de métodos analíticos para LD e LQ são de 3:1 e 10:1, respectivamente (INMETRO, 2007; RIBANI et al., 2004). Nesse sentido, observando as relações sinal-ruído obtidas para cada uma das concentrações estudadas, determinou-se os valores de LD e LQ, 0,08 mg L<sup>-1</sup> e 0,12 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 5.3.3 Precisão (Repetitividade e Precisão Intermediária) e Exatidão (recuperação)

Devido à inexistência de materiais de referência devidamente certificados para bentazona, os parâmetros recuperação e precisão (sob condições de repetitividade e precisão intermediária) foram pesquisados em ensaios com formulações em três níveis de concentração, 0,12; 0,24 e 1,20 mg L<sup>-1</sup>, sendo sete replicatas independentes em cada nível.

A precisão foi obtida sob condições de repetitividade e precisão intermediária, expressa em termos de RSD e estimada por análise de variância dos resultados de recuperação, obtidos para as sete replicatas de cada nível de concentração avaliado (INMETRO, 2011).

A exatidão do método foi investigada por meio da média de recuperação, obtida para as sete replicatas nos níveis de concentração avaliado. O critério de aceitabilidade

adotado foi de média de recuperação entre 90 e 110%, conforme previsto pela ANVISA para análise de elementos a níveis traços (ANVISA, 2010).

Na Tabela 14, consta os resultados obtidos. Observa-se que a recuperação variou de 97 a 100% para o nível 0,12 mg L<sup>-1</sup>; de 96 a 98% para o nível 0,24 mg L<sup>-1</sup>; de 92 a 100% para o nível de 1,20 mg L<sup>-1</sup> e de 95 a 100% para a recuperação intra-dia. Estas porcentagens de recuperação obtidas encontram-se dentro do intervalo estipulado de recuperação para análise de resíduos. Os CV obtidos em todos os níveis foram inferiores a 6%, garantindo boa concordância das análises realizadas (ANVISA, 2010; INMETRO, 2007; RIBANI et al., 2004). Os resultados obtidos, por meio da avaliação da repetitividade, precisão intermediária e recuperação, indicaram adequada precisão e exatidão do método analítico desenvolvido.

Tabela 14 - Resultados obtidos para repetitividade e precisão intermediária para bentazona

Concentração mg L <sup>-1</sup>	Média ± Desvio	Recuperação (%)	CV (%)
<b>0,12 1º Dia</b>	0,117 ± 0,006	97,3	5,4
<b>0,12 2º Dia</b>	0,120 ± 0,007	99,8	5,5
<b>0,12 3º Dia</b>	0,121 ± 0,002	100,8	1,7
<b>0,24 1º Dia</b>	0,236 ± 0,016	98,2	5,3
<b>0,24 2º Dia</b>	0,232 ± 0,004	96,5	1,8
<b>0,24 3º Dia</b>	0,231 ± 0,011	96,1	4,6
<b>1,20 1º Dia</b>	1,108 ± 0,014	92,3	1,2
<b>1,20 2º Dia</b>	1,206 ± 0,027	100,5	2,2
<b>1,20 3º Dia</b>	1,184 ± 0,048	98,7	4,0
<b>0,12 - Intra-dia</b>	0,120 ± 0,01	100,0	4,5
<b>0,24 - Intra-dia</b>	0,230 ± 0,01	95,8	4,0
<b>1,20 - Intra-dia</b>	1,16 ± 0,05	95,8	4,5

Fonte: Arquivo próprio.

#### 5.3.4 Robustez do Método

A avaliação da robustez do método foi conduzida sob a variação da temperatura da coluna ( $\pm 3$  °C) e composição da fase móvel (MEOH : H<sub>2</sub>O e pH), utilizando padrão 1,00 mg L<sup>-1</sup> de bentazona. Os dados obtidos podem ser observados na Tabela 15. A partir destes resultados verificou-se que, as áreas dos picos cromatográficos correspondente a cada injeção de bentazona não apresentaram variação significativa, a um nível de confiança de 95%. O percentual de recuperação foi superior a 90%, encontrando-se dentro do intervalo de recuperação para análise de resíduos. A conformidade do sistema, avaliando os parâmetros, K, N e As, encontraram-se dentro das especificações, conforme Ribani et al. (2004). Essas observações indicam que o método desenvolvido apresentou-se robusto diante das variações a que foi submetido.

Tabela 15 - Resultados obtidos na avaliação da robustez do método para detecção e quantificação de bentazona (média  $\pm$  desvio padrão relativo,  $n = 3$ )

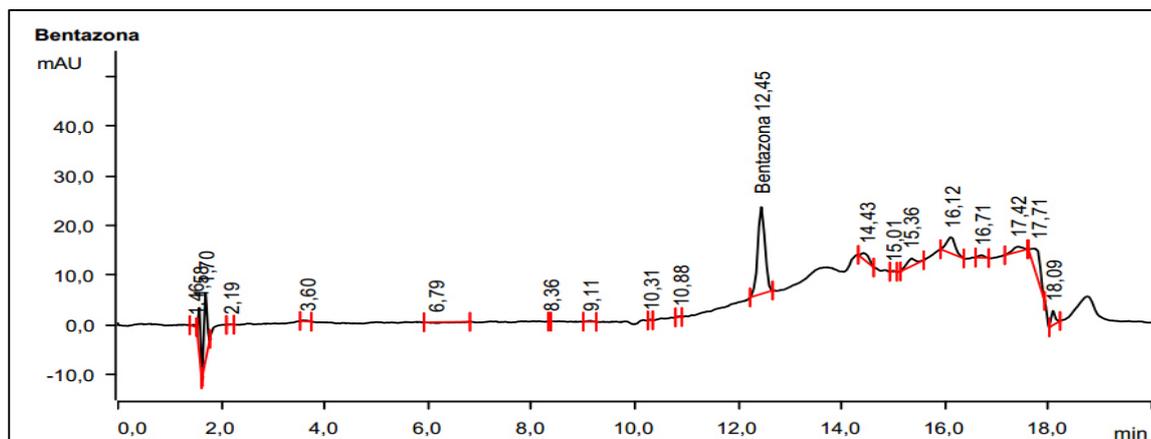
<b>Parâmetros</b>	<b>Nível</b>	<b>Recuperação (%) <math>\pm</math> RSD</b>
<b>Temperatura</b> <b>(Fases móvel 35:65 / 90:10 pH2.4)</b>	<b>42 °C</b>	<b>102.8 <math>\pm</math> 0.7</b>
	<b>45 °C</b>	<b>99.9 <math>\pm</math> 1.1</b>
	<b>48 °C</b>	<b>102.4 <math>\pm</math> 0.1</b>
<b>Composição da Fase móvel (Metanol:água) e pH</b> <b>(Utilizando temperatura da coluna a 45°C)</b>	<b>30:70 / 85:15 pH = 2.3</b>	<b>98.1 <math>\pm</math> 4.5</b>
	<b>30:70 / 85:15 pH = 2.5</b>	<b>93.1 <math>\pm</math> 0.2</b>
	<b>35:65 / 90:10 pH = 2.3</b>	<b>99.6 <math>\pm</math> 1.4</b>
	<b>35:65 / 90:10 pH = 2.5</b>	<b>93.1 <math>\pm</math> 0.2</b>
	<b>40:60 / 95:5 pH = 2.3</b>	<b>100.0 <math>\pm</math> 0.4</b>
	<b>40:60 / 95:5 pH = 2.5</b>	<b>97.4 <math>\pm</math> 3.1</b>

Fonte: Arquivo próprio.

#### 5.4 Aplicação do método desenvolvido para a determinação de Bentazona

O método foi desenvolvido e validado nas seguintes condições cromatográficas: sistema gradiente de eluição composto por duas fases móvel, constituídas por MEOH : H<sub>2</sub>O nas proporções 35:65 e 90:10, pH 2.4 ajustado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Tempo total de análise cromatográfica de 20 minutos, volume de injeção 90  $\mu$ L, fluxo variando em 1,00 e 1,20 mL Min<sup>-1</sup> e, t<sub>R</sub> do analito definido em 12,45 minutos. A figura 29, é referente ao cromatograma obtido para bentazona após desenvolvimento e validação das condições operacionais do método.

Figura 29 - Cromatograma referente a injeção de bentazona, 1 mg L<sup>-1</sup>, com relação sinal/ruído acima de 3:1.



Fonte: Arquivo próprio.

Após desenvolvimento e validação, o método foi empregado para a determinação de bentazona em 16 amostras de água, coletadas semanalmente no Rio Canas durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015. As amostras foram previamente preparadas conforme procedimentos descritos nos itens 4.2.3 e 4.2.4, empregando 1,00 L de água do Rio Canas em cada análise realizada.

As coletas de amostras de água realizadas no Rio Canas ocorreram sob condições climáticas chuvosas (amostras 2; 13; 14; 15 e 16) e ensolaradas, demais amostras. Os teores de bentazona quantificados encontram-se na Tabela 16. As Figuras 30 a 32, são referentes a cromatogramas obtidos das amostras 2, 7, e 9, respectivamente.

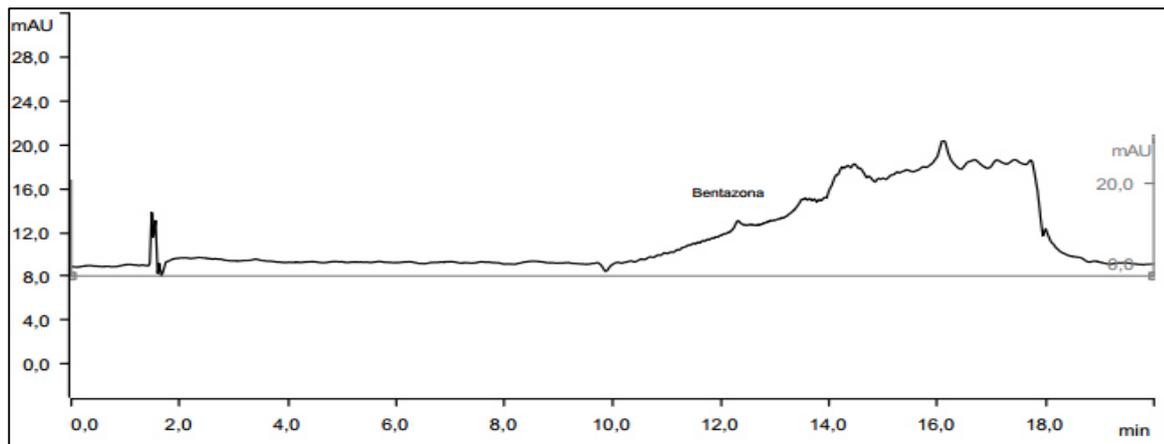
Tabela 16 - Teores de bentazona obtidos em amostras de água coletadas no Rio Canas durante os meses outubro, novembro e dezembro de 2015 (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3)

<b>Amostras</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Mês</b>	<b>Clima</b>
1	2,166 $\pm$ 0,006	Outubro	Sol
2	0,199 $\pm$ 0,002	Outubro	Chuva
3	3,606 $\pm$ 0,005	Outubro	Sol
4	3,642 $\pm$ 0,005	Outubro	Sol
5	3,423 $\pm$ 0,004	Novembro	Sol
6	3,415 $\pm$ 0,015	Novembro	Sol
7	3,560 $\pm$ 0,007	Novembro	Sol
8	3,717 $\pm$ 0,002	Novembro	Sol
9	5,542 $\pm$ 0,002	Novembro	Sol
10	4,886 $\pm$ 0,002	Novembro	Sol
11	2,608 $\pm$ 0,002	Novembro	Sol
12	3,597 $\pm$ 0,003	Novembro	Sol
13	D/NQ	Dezembro	Chuva
14	D/NQ	Dezembro	Chuva
15	D/NQ	Dezembro	Chuva
16	D/NQ	Dezembro	Chuva

D = Detectado NQ = Não Quantificado

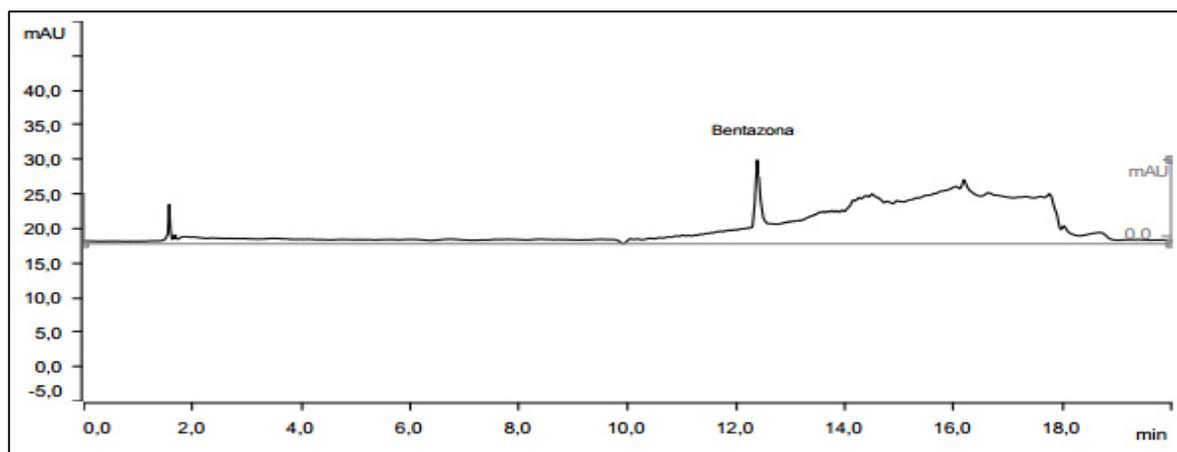
Fonte: Arquivo próprio.

Figura 30 - Cromatograma referente a amostra 2, bentazona 0,199 mg L<sup>-1</sup>, coletada no Rio Canas no mês de outubro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1



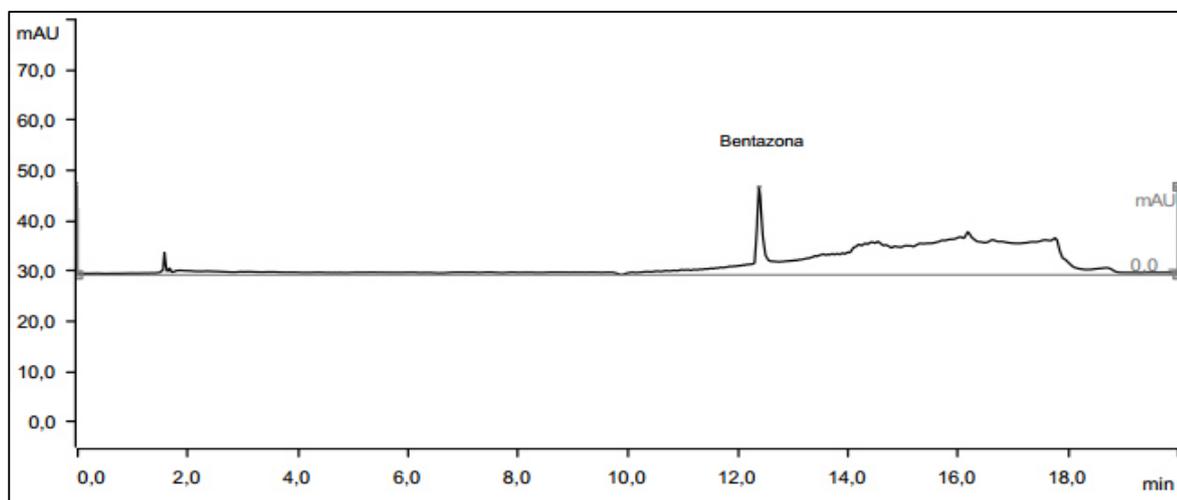
Fonte: Arquivo próprio

Figura 31 - Cromatograma referente a amostra 7, bentazona 3,560 mg L<sup>-1</sup>, coletada no Rio Canas no mês de novembro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1



Fonte: Arquivo próprio

Figura 32 - Cromatograma referente a amostra 9, bentazona 5,524 mg L<sup>-1</sup>, coletada no Rio Canas no mês de novembro/2015, com relação sinal/ruído acima de 3:1



Fonte: Arquivo próprio.

Ao realizar a análise estatística pelo Teste de Tukey, observou-se que as concentrações de bentazona variaram significativamente a cada coleta realizada, exceto entre as amostras 3 e 12, realizadas nos meses de outubro e novembro, respectivamente, e entre as amostras 5 e 6, realizadas no mês de novembro.

O método predominante de aplicação do herbicida nas culturas de arroz no município de Canas é por via líquida. Nesta aplicação, uma formulação é geralmente diluída em água, formando a calda que, via de regra, é aplicada na forma de gotas através de pulverização. Durante o 2º semestre de 2015, a aplicação de bentazona nas culturas ocorreu nos meses de setembro e novembro.

Após a aplicação do pesticida em uma cultura, por meio de diferentes métodos, vários processos, físicos, químicos e biológicos, determinam seu comportamento. O destino dos pesticidas no ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial) (SPADOTTO, 2006). Sob influência da temperatura e luz solar, os pesticidas estão sujeitos a degradação química, bacteriana e a fotodegradação. A ocorrência desses processos podem ter contribuído para que diferentes concentrações de bentazona fossem obtidas durante as coletas realizadas nestes meses.

Spadotto (2006) menciona que as condições meteorológicas, localização da área na topografia e práticas de manejo agrícola podem, entre outros, afetar o destino dos pesticidas no ambiente. O volume, a intensidade e a frequência das chuvas têm grande influência no transporte e na perda de pesticidas, através do escoamento superficial e da percolação da água no solo.

A baixa concentração de bentazona obtida na amostra 2 ( $0,199 \text{ mg L}^{-1}$ ) e a não quantificação (somente detecção) de bentazona nas amostra 13 a 16, pode ser em decorrência ao período chuvoso observado nestas semanas dos meses de outubro e dezembro/2015. Além da chuva intensificar os processos supracitados, o aumento do volume de água favorece a diluição dos pesticidas e, conseqüentemente, menores concentrações foram quantificadas.

No período de chuva, grande parte da matéria orgânica presente no solo pode sofrer escoamento superficial. Esta matéria orgânica contida no solo e em águas naturais encontram-se como substâncias húmicas (SH). Essas substâncias são uma mistura complexa de moléculas, semelhantes entre si e formadas pela decomposição biológica e enzimática de vegetais no solo. São transportadas às águas naturais por processos de lixiviação, escoamento e/ou podem, também, ser formadas diretamente no meio aquático

por decomposição de plantas e organismos aquáticos (TOSCANO; RIBEIRO; ROCHA, 2000).

As interações destas SH com compostos orgânicos antropogênicos, como os pesticidas, estão relacionadas com efeitos de adsorção, solubilidade, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes. O efeito solubilizante do material húmico sobre compostos orgânicos pode desempenhar importante papel na dispersão, mobilidade e transporte desses produtos no ambiente aquático (TOSCANO; RIBEIRO; ROCHA, 2000).

O pesticida pode ser transportado pela água da chuva que escoar superficialmente e pelo solo erodido, sendo levado às partes mais baixas da topografia, podendo chegar até os rios, córregos, lagos e açudes. O pico de concentração de pesticidas em águas superficiais é registrado logo após períodos chuva (SPADOTTO, 2006). Pode-se dizer que esse evento é observado quando se analisa a diferença entre as concentrações de bentazona quantificadas nas amostras 2 e 3 (0,199 e 3,606 mg L<sup>-1</sup>), respectivamente.

Entende-se que, possivelmente, no período pós-chuva, há um aumento na concentração de pesticidas em rios localizados próximo as plantações que recebem a água drenada das culturas. Assim, é possível inferir que a diferença não significativa (Teste de Tukey), obtida entre as concentrações de bentazona das amostras 3 e 12, seja em decorrência ao escoamento superficial. A chuva pode ter carregado uma maior quantidade de herbicida para o rio, aumentando a concentração de bentazona quantificada na amostra 3.

A aplicação do bentazona na cultura de arroz durante a 1<sup>a</sup> semana de novembro de 2015, pode ter influenciado na obtenção de concentrações similares desse herbicida (amostras 5 e 6) e, no posterior aumento das concentrações obtidas (amostras 7; 8; 9; e 10). É recomendado manter estática a lâmina de água do cultivo, por um período mínimo de duas semanas após a aplicação do pesticida (COPATTI; GARCIA; BALDISSEROTTO, 2009).

Nas culturas de arroz irrigado no município de Canas, a lâmina de água é mantida estática por aproximadamente 10 dias. Durante este período, a vazão de drenagem da água nas quadras de arroz diminui significativamente, aumentando a concentração do herbicida no interior das mesmas e, conseqüentemente, diminuindo-a ou mantendo-a constante na água do Rio Canas. Assim, quando a lâmina de água encontrava-se estática, obteve-se concentrações de bentazona similares (amostras 5 e 6) e, quando a vazão de drenagem da água foi normalizada nas quadras de arroz, obteve-se valores maiores de bentazona nas amostras coletadas posteriormente (amostras 7; 8; 9 e 10).

Conforme já mencionado, o Brasil carece de uma legislação mais eficiente que determine os limites de concentração máxima para a maioria dos pesticidas comercializados. A legislação anterior, Portaria MS nº 518/2004, a Portaria atual do MS nº 2.914/2011, define VMP para bentazona sendo como 0,300 mg L<sup>-1</sup>. Nesse sentido, o método desenvolvido neste estudo, pode ser aplicado para vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de qualidade, uma vez que atende ao VMP para bentazona estabelecido pelo ministério da saúde.

Ao analisar as concentrações de bentazona obtidas nas amostras de água coletadas no Rio Canas, foi possível observar que todos estes valores (Tabela 16) foram superiores ao VMP, exceto amostra 2, onde bentazona foi quantificado na concentração referente a 0,199 mg L<sup>-1</sup>.

## 6 Conclusões

Os testes de toxicidade aguda com glifosato e bentazona ocasionaram imobilidade dos organismos *D. similis* em concentrações superiores a 4,00 mg L<sup>-1</sup> e 0,300 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na avaliação da toxicidade crônica, o glifosato dentro das concentrações estudadas, estimulou o crescimento da alga *P. subcaptata* em até 268%. Possivelmente, em decorrência da degradação desse I.A, moléculas foram disponibilizados para o meio, contribuindo para o crescimento algáceo observado. Os resultados obtidos no teste de toxicidade crônica com bentazona mostraram que esse I.A possivelmente, ocasionou a inibição do crescimento algal em todas as concentração analisadas neste trabalho, sendo que o maior percentual de inibição de crescimento (86%) foi constatado em três das concentrações avaliadas (0,500; 0,700 e 1,00 mg L<sup>-1</sup>).

Aplicando o método de Goss, bentazona foi classificado como baixo potencial de transporte associado ao sedimento e, médio potencial de transporte dissolvido em água. O glifosato foi classificado como médio potencial de transporte associado ao sedimento e dissolvido em água.

Pelo índice GUS, o glifosato (GUS = - 0,41) foi classificado na categoria de pesticidas que não sofrem lixiviação (GUS ≤ 1,8) e, o bentazona (GUS = 3,45) na categoria de provável lixiviação (GUS ≥ 2,8). Pelo método de screening EPA os I.A, bentazona e glifosato, foram classificados como contaminante em potencial e contaminante parcialmente positivo, respectivamente.

Por meio da realização do estudo da análise de risco de contaminação ambiental teórica, foi possível selecionar qual I.A exibia maior potencial de contaminação de águas superficiais, podendo assim, desenvolver e validar o método analítico cromatográfico.

No estudo das figuras de mérito para a validação do método desenvolvido, foram obtidos níveis de recuperação do analito superiores a 90 %. Os CV observados em todas as análises foram inferiores a 6%, a garantindo concordância entre os procedimentos realizados, indicando que o método desenvolvido apresentou adequada precisão e exatidão. Após a verificação e certificação de todas as premissas, foi possível validar o método para determinação de bentazona em água.

Aplicando o método desenvolvido foi possível quantificar resíduos de bentazona em amostras de água do Rio Canas, durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2015. As concentrações de bentazona em água variaram de 0,199 a 5,524 mg L<sup>-1</sup>.

## 7 Perspectivas futuras

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a realização de estudos posteriores como:

- Desenvolvimento de possíveis e viáveis tratamentos que possam ser aplicados no efluente que é drenado das culturas de arroz irrigado;
- Avaliação e monitoramento da qualidade da água do Rio Canas;
- Aplicação do método desenvolvido para determinação de bentazona a jusante e a montante do Rio Canas, assim como, dentro das quadras de arroz irrigado;
- Avaliação ecotoxicológica dos produtos comerciais Basagran®, Roundup® e dos ingredientes inertes que compõem esses produtos;
- Estudo de outros I.A que são utilizados nas culturas de arroz irrigado e possível inclusão desses ao método desenvolvido;
- Desenvolvimento de método cromatográfico para determinação de glifosato no sedimento;
- Desenvolvimento de estudos para melhor entender os processos de dispersão, transporte, degradação, adsorção e hidrólise dos pesticidas;
- Trabalhos de conscientização dos agricultores, da população, sobre os impactos que os pesticidas podem causar ao ambiente e, como esses podem ser minimizados.

Referências<sup>13</sup>

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - Água – Ensaio de Toxicidade aguda com *Daphnia similis* claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713/2004**. Rio de Janeiro, ABNT, p.16. 2004.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas - Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). **Norma NBR 12648/2005**. Rio de Janeiro, ABNT, p.24, 2005a.

Agência Nacional de Águas; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **GUIA NACIONAL DE COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS**, Brasil, 2011.

**Agrotóxicos e Fiscalização**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrototoxicos/fiscalizacao>>. Acesso em: 14 out. 2015.

ALI, U. et al. Organochlorine pesticides (OCPs) in south asian region: A review. **Science of The Total Environment**, v. 476-477, p. 705–717, abr. 2014.

ALMEIDA, A. DE; ELIAN, S.; NOBRE, J. Modifications and alternatives to the tests of Levene and Brown & Forsythe for equality of variances and means. **Revista Colombiana de Estadística**, v. 31, n. 2, p. 241–260, 2008.

AMARANTE, O. P. DE; SANTOS, T. C. R. DOS. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.

---

<sup>13</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnica.

ANDRADE, A. S. et al. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em município do Alto Paranaíba - MG. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1129–1135, 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **A Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 - Diário Oficial da União**, 2012.

ANVISA - **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D.O.U - Diário Oficial da União**, Brasil, p. 1-15, 2010.

APHA - American public health association (AWWA), Water environmental federation (WEF). *Standart methods for the examination of water and wastewater*, 20 ed. Washington, 1999.

ARANTES, S. A. DO C. M.; LAVORENTE, A.; TORNISIELO, V. L. Effects od liming on the mineralization of <sup>14</sup>C-glyphosate in soils. **Ciências Agrotécnica**, v. 35, n. 2, p. 234–241, 2011.

ARAUJO, P. KEY. Aspects of analyticas method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, ago. 2009.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391–396, 1 jun. 2006.

**Avaliação do potencial de periculosidade ambiental (PPA) - Qualidade ambiental.** Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa>>. Acesso em: 13 out. 2015.

BARBER, J. Photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1365, n. 1-2, p. 269–277, jun. 1998.

BARBER, J.; KÜHLBRANDT, W. Photosystem II. **Currente opinion in structural Biology**, v. 9, p. 469–475, 1999.

BATTAGLIN, W.A. et al. Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. **The Science of the Total Environment**, v. 248, p. 123-133, 2000.

BOMFIM, M. V. J.; ABRANTES, S. DE M. P.; ZAMITH, H. P. DA S. Validação de método analítico para determinar a migração de  $\epsilon$ -caprolatama das embalagens para alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1114–1118, 2010.

BRAIBANTE, E. M. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.

BRAUN, A. et al. Ecotoxicological effects os vertimec® 18EC on palnkton. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n. 2, p. 23–29, 5 dez. 2012.

CARLOS, L.; LIMA, W. **Índice monográfico Anvisa**. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[4882-2-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[4882-2-0].PDF)>. Acesso em 07 abr. 2014.

CEREJEIRA, M. et al. Pesticides in portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v. 37, n. 5, p. 1055–1063, mar. 2003.

CHEN, S.; CHEN, B.; FATH, B. D. Ecological risk assessment on the system scale: A review of state-of-art models and future perspectives. **Ecological Modelling**, v. 250, p. 25–33, fev. 2013.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Consultas Pública**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacaoconsultas-publicas>>. Acesso em: 13 out. 2015.

COPATTI, C. E.; GARCIA, L. D. O.; BALDISSEROTTO, B. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 4, p. 235–242, dez. 2009.

COSTA, C. R. et al. A Toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 995–1002, nov. 2002.

DEMMIG, B. et al. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves : a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. **Plant physiology**, v. 84, n. 2, p. 218–224, jun. 1987.

DORES, E. F. G. D. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27–36, fev. 2001

EURACHEM. **Euachem guide: The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics**. Eurachem Guide, 2014.

Disponível em: <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>. Acesso 17 nov. 2015.

EGEIS - European Glyphosate Environmental Information Source. Disponível em <http://www.egeis.org/>. Acesso 21 dez. 2015.

GALHANO, V. et al. Impact of herbicides on non-target organisms in sustainable irrigated rice production systems: State of knowledge and future prospects. In: KORTEKAMP, D. A. **Herbicides and Environment**. Rijeka, Croacia. p. 47–65.

GARRIDO, M. E. et al. Electrochemical oxidation of bentazon at a glassy carbon electrode Application to the determination of a commercial herbicide. **Talanta**, v. 46, n. 5, p. 1131–1135, ago. 1998.

GREEN, J. et al. Analytical method validations. In: **Analytical Chemistry News and Features**. 2ª ed. Amsterdam, NL, p. 1–532, July, 2011.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente Recursos Naturais e Renováveis. **Requisito legal e competência do Ibama Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2015.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia - **Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008**, 2011. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf)>. Acesso em: 9 dez. 2015.

KHATOON, M. et al. Quality control of photosystem II: Thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress

in spinach thylakoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 37, p. 25343–25352, 11 set. 2009.

JONSSON, C. M.; AOYAMA, H. Extraction, partial characterization and susceptibility to Hg<sup>2+</sup> of acid phosphatase from the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 5, p. 634–642, out. 2009.

JONSSON, C. M.; MAIA, A. DE H. N. Avaliação da toxicidade do lodo de esgoto de duas estações de tratamento para o invertebrado aquático *Daphnia similis*. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.**, v. 17, p. 1–8, 2007.

LOURENCETTI, C. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Revista Ecotoxicologia e meio ambiente.**, v. 15, p. 1–14, 2005.

MACEDO, R. S. et al. Effects of the herbicide bentazona on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 716–722, 2008.

MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO-FILHO, A. D. S. Ecotoxicology as a tool aquatic ecosystem. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, out. 2008.

MARCHI, G.; SANTOS, E. C.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: Mecanismo de ação e uso**. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2008.

MARTINI, L. F. D. et al. Risco de contaminação das águas superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para cultura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1715–1721, 2012.

MCKNIGHT, U. S. et al. SOURCES, Occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. **Environmental pollution**, v. 200, p. 64–76, maio 2015.

MENEZES, C.; HELLER, L. In: Margarita Stoytcheva (ed). Pesticides Surveillance on Surface Waters: Developing a Method for Watersheds Prioritization. **Pesticides - Formulations, Effects, Fate**. Croatia, p. 269–283, 21. jan. 2011.

MESQUITA BRITO, N. et al. Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: Análise preliminar. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 93–104, 2001.

MILHOME, M. A. L. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363–372, 2009.

MONSANTO. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos, 2014**. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/globalbr/produto/documents/roundup-original-di-fispq.pdf>>. Acesso em 23 ago. 2015.

MORAES, P. V. D.; ROSSI. Comportamento ambiental dos agrotóxicos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p. 22–35, 2010.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA, C. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura de arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, p. 93–100, 2006.

NOGUEIRA, E. N. et al. Currently used pesticides in water matrices in central-western Brazil. **Journal Braz. Chem. Soc**, v. 23, n. 8, p. 1476–1487, 2012.

**Normas Jurídicas LEI 7802 de 11/07/1989. Diário Oficial da União**, 1989. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=469>>. Acesso em: 13 out. 2015

PAPADAKIS, E.-N. et al. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 536, p. 793–802, dez. 2015.

PARTOAZAR, M.; HOODAJI, M.; TAHMOURESPOUR, A. The effect os glyphosate application on soil microbial activities in agricultural land. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 83, p. 19419–19424, 2011.

PEDLOWSKI, M. A. et al. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protection**, v. 31, n. 1, p. 113–118, jan. 2012.

PETERSON, R. B.; AYLOR, D. E. Chlorophyll Fluorescence Induction in Leaves of *Phaseolus vulgaris* Infected with Bean Rust (*Uromyces appendiculatus*). **Plant physiology**, v. 108, n. 1, p. 163–171, maio 1995.

PINHEIRO, M. L. et al. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 972–977, 2010.

PINTO, G. M. F.; JARDIM, I. C. S. F. Determination of bentazon residues in water by high-performance liquid chromatography. Validation of the method. **Journal of chromatography A**, v. 846, n. 1-2, p. 369–374, 1999.

POMPEO QUEIROZ, G. M. et al. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 190–195, 2011.

**Portaria MS nº 518/2004**. Disponível em: <<http://www.aeap.org.br/doc/portaria518de25de marco2004.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2015

**Portaria MS nº 2.914/2011**. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html). Acesso em 25 set. 2015.

**Perguntas e respostas sobre a Portaria MS nº 2.914/2011**. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/24/PERGUNTAS-E-RESPOSTAS-SOBRE-A-PORTARIA-MS-N-2-914.pdf>. Acesso em 27 ago. 2015

POURATA, R. et al. Removal of the herbicide Bentazon from contaminated water in the presence of synthesized nanocrystalline TiO<sub>2</sub> powders under irradiation of UV-C light. **Desalination**, v. 249, n. 1, p. 301–307, nov. 2009.

PRATA, F. et al. Sorção e dessorção de glifosato em solos com distintos níveis de fósforo. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 1, p. 175–180, 2003.

PRESTES, E. B.; JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. S. S. DE. Avaliação da toxicidade de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.**, v. 21, p. 39–46, 2011.

PRIMEL, E. G. et al. Poluição da águas por herbicidas utilizados nos cultivo de arroz irrigado na região central do Rio Grande do Sul: Predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 605–609, ago. 2005.

RASMUSSEN, J. J. et al. The legacy of pesticide pollution: An overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. **Water Research**, v. 84, n. September, p. 25–32, nov. 2015.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Environmental risk assessment of aquatic systems affected by pesticide use. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199–1208, 2014.

REIS, M. A. DOS et al. Determination of fenofenadine in hank's balanced salt solution by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: Application to caco-2 cell permeability studies. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 29, n. 4, p. 537–544, abr. 2015.

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

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos : impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149–158, 2009.

RIBEIRO, M. L. et al. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 688–694, 2007.

ROZET, E. et al. Advances in validations, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 848–858, jun. 2011.

SÄMY, C. H.; TORRENS, B. M. DE O.; MEDEIROS, S. H. W. Estudo do impacto ambiental na Bacia do Braço através de análises ecotoxicológicas. **Revista de ciências ambientais**, v. 4, n. 2, p. 45–55, 2010.

Sanco/10329/2002. **Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC**. European Commission Health & Consumer Protection Directorate - General, p. 1-37, 17 out. 2002.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1-3, p. 45–95, 15 mar. 2010.

SANTOS., M. M. DOS. **Avaliação de risco ambiental de agrotóxicos no Ibama**. Brasília, p. 1-24, 2012.

SCHULZ, R. Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens river, western cape south Africa: Importance of a single event. **Water Research**, v. 35, n. 8, p. 1869–1876, jun. 2001.

SCORZA, R. P. Pesticidas, Agricultura e Recursos Hídricos. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 1–9, 2006.

SHARMA, B. M. et al. Environment and human exposure to persistent organic pollutants (POPs) in India: A systematic review of recent and historical data. **Environment International**, v. 66, p. 48–64, maio 2014.

SILVA, M. R. DA; CAMPOS, A. C. E. DE; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p. 46–58, 2013.

SILVA, E.; CEREJEIRA, M. J. Avaliação do risco de pesticidas individuais e suas misturas em águas de superfície. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 32–42, 2012.

SILVA, I. P. D. F. E. et al. Photosystem II inhibitor herbicides. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 7, n. 1, p. 12–22, 2013.

SILVA, M. F. D. O. E.; COSTA, L. M. DA. A indústria de defensivos agrícolas. **BNDS Setorial**, v. 35, p. 233–276, 2010.

SOARES, A. F. S. et al. Risk estimate of water contamination by pesticides used in coffee crops. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 4, p. 425–432, abr. 2012.

SOUZA, A. D. T.; MATTA, H. D. R. D. M.; ABREU, A. B. G. DE. Estudo de recuperação de Glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1372–1376, 2006.

SOUZA, J. F. et al. Development and validation of spectrophotometric method for the determination of bromodine into ocular implants. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 927–941, 2014.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A produce to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25–35, nov. 2005.

SPADOTTO, C. A. Screening method for assessing pesticide leaching potential. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 69–78, 2002.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, v. 2, n. January, p. 1–9, 2006.

STEMLER, A.; MURPHY, J. Inhibition of HCO(3) Binding to Photosystem II by Atrazine at a Low-Affinity Herbicide Binding Site. **Plant physiology**, v. 77, n. 1, p. 179–82, jan. 1985.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. **A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: Das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. Evolução e Dinâmica dos Sistemas Agroalimentares e Cadeias**, 2007.

THE CHEMICAL COMPANY, B. Ficha de segurança Basagran, 2011. Disponível em: <[http://jmgps.pt/pdfs/Fichas\\_de\\_Seguranca/Etanol\\_70.pdf](http://jmgps.pt/pdfs/Fichas_de_Seguranca/Etanol_70.pdf)>. Acesso em: 11 mai, 2015.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis**. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/pac.2002.74.issue-5/pac200274050835/pac200274050835.xml>>. Acesso em 02 dez. 2015.

TOMITA, R. Y. Legislação de agrotóxicos e sua contribuição para a proteção da qualidade do meio ambiente. **O Biológico**, v. 67, n. 12, p. 1–10, 2005.

TONI, L. R. M.; DE SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829–833, 2006.

TOSCANO, I. A. .; RIBEIRO, M. L.; ROCHA, J. C. Determination of carbaryl by elisa (enzym-linked immunosorbent assay) and HPLC with photodiode array detection. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 466–471, 2000.

US-FDA - United State Department of health and human services food and drugs administration. **Analytical procedures and methods validation.**, p. 1-35, 2000

VEIGA, C. M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil. **Cad.Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

VELASCO, L. O. M. DE; CAPANEMA, L. X. D. L. O setor de agroquímicos. **BNDES Setorial**, v. 24, p. 69–96, 2006.

YADAV, I. C. et al. Currente statur of persisten organic pesticides residues in air, water, and soil, and theis possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. **Science of The Total Environment**, v. 511, p. 123–137, abr. 2015.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. DE C. E. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. **International Plant Nutrition Institute - IPNI**, v. 119, p. 1–32, 2007.

ZANELLA, R. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 9-10, p. 935–938, 1 jul. 2003.

ZANELLA, R. et al. Herbicides persistence in rice paddy water in southern Brazil.. In: HASANEEN, M. N. A. E. **Herbicides - Mechanism and Mode of Action**. 1<sup>a</sup> ed; Rijeka, Croacia. p. 183–204, dez, 2011.