

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS DA SOJA EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS POR GC-ECD

Cristina Gonçalves¹; Liamara Eliete Gomes²; Gabriela Maria Arantes Rodrigues³; Lídia Katsuoka⁴; Clarice Yumi Hiramatsu⁵ Patrícia Ferreira Silvério⁶

RESUMO

Devido ao contínuo crescimento da produção de soja no Brasil, aumenta-se a preocupação em relação à possível contaminação de solo e água subterrânea pelo uso de agrotóxicos para combate a pragas do cultivo da soja.

Muitos dos pesticidas da soja são tóxicos ao homem e ao meio ambiente e por isto, a qualidade de águas subterrâneas em áreas de cultivo e estoque de soja deve ser avaliada. Uma das dificuldades encontra-se na escassez de métodos analíticos já validados e reconhecidos internacionalmente para serem adotados pelos laboratórios de análises ambientais para investigação destes compostos.

Desta forma, este trabalho apresenta a validação de um método para determinação de oito pesticidas da soja em águas subterrâneas, a saber: tiametoxam, bifentrina, tralometrina, tetrametrina, imazetapir, tiabendazol, piraclostrobina e zeta-cipermetrina.

O método, o qual foi testado em amostras de água subterrânea, consistiu na extração líquido-líquido com diclorometano, *clean-up* com florisil e análise por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons. O cromatógrafo utilizado foi dotado de dois detectores, com colunas dissimilares, uma para quantificação e outra para confirmação, visando minimizar eventual interferência de compostos que coeluem com os analitos-alvo.

ABSTRACT

Due to the continuous growing of Brazilian soy production, it increases the concern about possible soil and groundwater contamination by use of agrotoxics.

¹ Consultoria Paulista de Estudos Ambientais: Rua Henrique Monteiro, 90 – 13º Andar, Pinheiros 05423-020 São Paulo-SP Tel: (11) 4082-3200 Fax: (11) 3819-2815 e-mail: cristina.goncalves@cpeanet.com

² Consultoria Paulista de Estudos Ambientais: Rua Henrique Monteiro, 90 – 13º Andar, Pinheiros 05423-020 São Paulo-SP Tel: (11) 4082-3200 Fax: (11) 3819-2815 e-mail: liamara.gomes@cpeanet.com

³ Consultoria Paulista de Estudos Ambientais: Rua Henrique Monteiro, 90 – 13º Andar, Pinheiros 05423-020 São Paulo-SP Tel: (11) 4082-3200 Fax: (11) 3819-2815 e-mail: gabriela.arantes@cpeanet.com

⁴ Corplab Brasil: Rua Galatéia, 1824, Santana 02068-000 São Paulo-SP Tel: (11) 2221-0127 e-mail: lkatsuoka@corplab.net

⁵ Corplab Brasil: Rua Galatéia, 1824, Santana 02068-000 São Paulo-SP Tel: (11) 2221-0127 e-mail: cyumi@corplab.net

⁶ Consultoria Paulista de Estudos Ambientais: Rua Henrique Monteiro, 90 – 13º Andar, Pinheiros 05423-020 São Paulo-SP Tel: (11) 4082-3200 Fax: (11) 3819-2815 e-mail: patricia.silverio@cpeanet.com

Many of soy pesticides are toxic to human being and environment. Therefore, groundwater quality in areas of soy crop and storage needs to be investigated. One of the difficulties is the lack of analytical methods already validated and internationally recognized to be adopted by environmental analytical laboratories in order to evaluate the behavior of these compounds.

Thus, this work presents validation of a method to determine eight soy pesticides in groundwaters: thiametoxan, bifenthrin, tralomethrin, tetramethrin, imazethapyr, thiabendazol, pyrachlostrobine and zeta-cypermethrin.

The method, which was tested in groundwater samples, consisted of liquid-liquid extraction with dichloromethane, florisil clean-up and analysis by electrons capture detector gas chromatography. The equipment used had two detectors coupled to dissimilar columns, one for quantitation and another one for confirmation; the aim was to minimize occasional interference of coeluting compounds with target-analytes.

PALAVRAS-CHAVE: pesticidas, soja, GC- ECD, água subterrânea

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a EMBRAPA [1], o Brasil é responsável por 27% da produção mundial de soja e é o segundo produtor mundial do grão, verificando-se uma contínua expansão nas áreas cultivadas com soja, com investimentos em tecnologia, visando o aumento da produtividade.

Embora a produção de soja seja de extrema relevância para a economia brasileira, um dos obstáculos enfrentados é a ocorrência de pragas que podem reduzir a produtividade, sendo a administração de agrotóxicos uma das providências eficazes no combate a estas pragas.

No estágio atual de desenvolvimento de pesquisa e tecnologia, os agrotóxicos ainda são essenciais para viabilizar a produção da soja em grande escala, porém se não forem bem administrados, os mesmos podem contaminar o meio ambiente, afetando a qualidade da água subterrânea.

Desta forma, a orientação quanto à maneira correta de aplicação dos agrotóxicos e de avaliação de sua eficiência deve estar voltada para evitar a contaminação do solo, pois, uma vez presentes no mesmo, podem lixiviar e atingir o lençol freático.

Entre os vários agrotóxicos da soja, destacam-se os grupos neonicotinóide, e piretróide, da classe inseticida, uréia, da classe herbicida, e carbamatos, da classe fungicida. Entre os representantes destes grupos, pode-se citar:

Neonicotinóide: tiametoxam

Piretróide: cipermetrina, tralometrina, tetrametrina

Uréia: imazetapir, tiabendazol

Carbamato: piraclostrobina

Para facilitar a orientação em relação aos agrotóxicos, foi normatizado em 1996, no Brasil, o conceito de potencial de periculosidade ambiental (PPA) para agrotóxicos e definida a sua aplicação. A competência para avaliar o comportamento ambiental dos agrotóxicos e estabelecer suas classificações quanto ao PPA é do Ministério do Meio Ambiente, conforme definido na Lei dos Agrotóxicos (BRASIL, 1998) [2]. O IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) dispõe da Portaria Normativa nº 84, de 15/10/1996 (BRASIL, 1996) [3] para classificação do PPA nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. Segue-se a seguinte graduação de classes:

Classe I – Altamente Perigoso ($DL_{50} \leq 5$ mg/Kg);

Classe II – Muito Perigoso ($DL_{50} = 5-50$ mg/Kg);

Classe III – Perigoso ($DL_{50} = 50-500 \text{ mg/Kg}$);

Classe IV – Pouco Perigoso ($DL_{50} \geq 500 \text{ mg/Kg}$).

Desta forma, a periculosidade ambiental é atribuída a características do agrotóxico que promovem contaminação e danos aos compartimentos bióticos e abióticos dos ecossistemas.

A Tabela 1 apresenta a classificação de alguns dos agrotóxicos da soja, segundo publicado pela ANVISA no Diário Oficial da União (2002) [4]. Alguns ingredientes ativos, embora não sejam altamente nocivos ao homem, são considerados tóxicos ambientalmente e por esta razão merecem um estudo mais detalhado do seu comportamento nas áreas de produção de soja. A Tabela 1 contempla a classificação de agrotóxicos de acordo com a toxicidade ambiental.

Diante deste cenário, verifica-se a necessidade de se conhecer melhor o comportamento químico dos agrotóxicos da soja no meio ambiente, partindo-se da quantificação dos mesmos. O atendimento a esta necessidade torna fundamental o desenvolvimento de técnicas analíticas que propiciem a identificação e quantificação de resíduos de pesticidas.

Não há atualmente método aprovado pela US EPA para determinação dos pesticidas da soja em concentrações traço, fato que limita encontrar laboratórios que realizem este ensaio, sendo, portanto, determinado apenas em institutos de pesquisa. Os métodos mais comumente utilizados para determinação dos pesticidas da soja são cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado (GC-MS) e cromatografia gasosa com detector de captura eletrônica (GC-ECD). Os limites atingidos por HPLC (1 a 2 $\mu\text{g/L}$) são elevados aos obtidos por GC-MS e GC-ECD (2-10 ng/L) [10].

A técnica de GC-ECD tem como vantagem à de GC-MS a detectabilidade para compostos que possuam na sua estrutura molecular cloro, nitrogênio e enxofre.

Desta forma, este trabalho apresenta a validação de método analítico para quantificação de pesticidas da soja em amostras de água subterrânea por GC-ECD.

Tabela 1. Classificação Toxicológica e Ambiental de Agrotóxicos da Soja

Classificação Toxicológica	Classificação Ambiental	Ingrediente ativo ⁽¹⁾	Classe ⁽¹⁾	Grupo Químico ⁽¹⁾	Comportamento no solo ^(2, 3, 4, 6)	Toxicidade a peixes (CL50) ^(2, 5, 6)
Classe toxicológica IV (Rótulo Verde): produto considerado praticamente "não-tóxico" para o ser humano.	III – perigoso	Imazetapir	Herbicida	Uréia	Lixiviação: Provável Adsorção: fraca Degradação: lenta, microbiana Persistência: 1-3 meses Risco potencial ao solo: alto	>240 mg/L
	II – muito perigoso	Tiabendazol	Herbicida	Sulfoniluréia	Não sofre lixiviação	1,3 mg/L
Classe toxicológica III (Rótulo Azul): produto considerado pouco tóxico para o meio ambiente	I - produto altamente perigoso	Tetrametrina	Inseticida	Éster piretróide	Degrada-se facilmente quando exposto à luz solar e por microorganismos aeróbios	0,01-75 mg/L
		Tralometrina	Inseticida	Éster piretróide	Não persistente	0,0016 mg/L
	III – perigoso	Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinóide	Moderadamente persistente	>100 mg/L
Classe toxicológica II (Rótulo Amarelo): produto considerado medianamente tóxico para o ser humano	III – perigoso	Bifentrina	Inseticida, formicida, acaricida	Piretróide	Não sofre lixiviação	0,01-75 mg/L
		Cipermetrina	Inseticida, formicida	Piretróide	Não sofre lixiviação	0,01-75 mg/L
		Piraclostrobina	Fungicida	Carbamato	Moderadamente persistente	6000 mg/L

(1) Diário Oficial da União, número 92, 15/05/2002. [4]

(2) Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 44, Embrapa, Junho de 2007. [5]

(3) Monitoramento Ambiental (Proposta de Projeto) – Determinação de Índices de Agrotóxicos presentes na área da Unidade de Conservação – Parque Nacional das Emas (GO), Ibama. [6]

(4) DORES, E.F.G.C.; Lamônica-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 - *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 27-36, 2001. [7]

(5) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR). Toxicological Profile for Pyrethrins and Pyrethroids. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA: US, 2003. [8]

(6) IUPAC - Global availability of information on agrochemicals. [9]

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo apresentar metodologia desenvolvida para quantificação de oito pesticidas da soja em águas subterrâneas por cromatografia gasosa com duplo detector captura de elétrons (GC-ECD).

3. ANÁLISE

3.1. Reagentes

Os solventes utilizados foram *Mallinkrodt* grau pesticida. As soluções estoque foram preparadas a partir dos padrões de referência certificados (pureza $\geq 98\%$, todos *AccuStandard*) dissolvidos em metanol, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e as soluções de trabalho foram obtidas a partir da diluição da solução-estoque.

3.2. Validação de Metodologia

Para validação de metodologia, inicialmente realizou-se estudo de limite de detecção do método, de acordo com o Código de Regulamentação Federal dos EUA – CFR40, Parte 136, Apêndice B (CFR, 2009). [11]

Em seguida, coletou-se 1 litro de amostra de água subterrânea em vidro âmbar, em quadruplicata, proveniente de área isenta de suspeita de contaminação por pesticidas da soja. As replicatas foram fortificadas com concentrações em torno de dez vezes o limite de quantificação determinado, as quais são apresentadas na Tabela 2.

As amostras deste trabalho, tanto as confeccionadas para o estudo de limite de detecção como as coletadas, foram submetidas à extração líquido-líquido e concentração, conforme método US EPA 3510C (US EPA, 2009) [12]. Realizou-se clean-up com florisil, conforme US EPA 3620C (US EPA, 2009). [13].

As análises foram conduzidas por GC-ECD (cromatografia a gás com detector de captura de elétrons). Utilizou-se equipamento com dois detectores ECD, cada um deles com uma coluna distinta, sendo uma coluna usada para quantificação e outra para confirmação. Este procedimento é necessário, visto que o detector ECD está sujeito a interferências de outros compostos presentes na amostra, que possam sair no mesmo tempo de retenção do analito-alvo [14].

Tabela 2. Concentrações utilizadas para fortificação das amostras de água subterrânea, em ng/L

Composto	Concentração (ng/L)
Bifentrina	2200
Zeta-cipermetrina	500
Imazetapir	300
Piraclostrobina	13
Tetrametrina	6,0
Tiabendazol	13
Tiametoxam	7,0
Tralometrina	435

As condições analíticas estabelecidas para o equipamento são apresentadas a seguir:

Tabela 3. Condições analíticas em GC-ECD para quantificação dos agrotóxicos da soja investigados

GC	Equipamento	Programa de temperatura	Coluna	Gás de arraste
GC-ECD	Perkin Elmer – Clarus 500	180°C por 1 min, 3,5°C/min até 270°C, 3,5°/min até 270°C por 10 min e 45°C/min até 180°C por 2 min. Temperatura do injetor: 250 °C Temperatura do detector: 310 °C	A: DB-608 B:DB-1701, 30 m x 0,53 mm, Filme: 0,83 µm (A) 1 µm (B)	Nitrogênio (Arraste e make-up)

Os compostos analisados por GC-ECD são apresentados na Tabela 4 abaixo, juntamente com padrões utilizados e os tempos de retenção em cada coluna cromatográfica.

Tabela 4. Tempos de retenção, em minutos, dos compostos analisados neste trabalho por GC-ECD

Composto	Padrão	LQ (ng/L)	Coluna A	Coluna B
Bifentrina	P-445S	50 ppt	18,075	18,975
Zeta-cipermetrina	AE-00023	10 ppt	17,901	19,816
Imazetapir	P-285S	6 ppt	16,177	16,470
Piraclostrobina	P-863-CN	0,3 ppt	25,656	25,228
Tetrametrina	P-406S	0,1 ppt	20,364	20,559
Tiabendazol	P-068S	0,3 ppt	5,031	5,313
Tiametoxam	P-866S-CN	0,1 ppt	14,028	13,402
Tralometrina	P-478S	9 ppt	18,859	19,151

- (1) LQ = Limite de Quantificação
(2) Coluna A = DB-608
(3) Coluna B = DB-1701

Os limites de quantificação, apresentados na Tabela 4, foram obtidos baseando-se em três a cinco vezes o limite de detecção obtido (US EPA, 2003) [15]. Os resultados obtidos corroboram com estudos de validação anteriormente realizados por esta técnica [16, 17].

O método foi avaliado em águas subterrâneas. Para isto, fortificaram-se quatro réplicas de uma amostra coletada em área isenta de manejo de pesticidas da soja. Os resultados obtidos, em ng/L, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos na análise da amostra de água subterrânea fortificada, em ng/L

Composto	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
Bifentrina	2193	2206	2237	2723
Cipermetrina	432	515	494	423
Imazetapir	299	329	294	312
Piraclostrobina	13	13	12	13
Tetrametrina	5,0	6,0	5,0	5,0
Tiabendazol	12	15	13	15
Tiametoxam	6,0	6,0	8,0	6,0
Tralometrina	441	451	413	439

Os resultados de recuperação (exatidão), coeficiente de variação (precisão) e desvio-padrão relativo, baseados em quadruplicata, para cada composto investigado neste trabalho são apresentados na Tabela 6.

Ainda, para avaliar a exatidão, aplicou-se um teste de significância (teste t-Student), conforme pode ser observado na referida Tabela. É importante ressaltar que os resultados foram obtidos fortificando-se amostra de água subterrânea proveniente da região de estudo, isenta destes contaminantes.

Tabela 6. Análise de Significância para os agrotóxicos investigados

Composto	% Rec	CV (%)	DPR (%) (1)	t 95% (2)
Bifentrina	106	11	6,35	1,09
Cipermetrina	93	10	6,80	1,50
Imazetapir	103	5	2,75	1,06
Piraclostrobina	100	4	0,37	0,17
Tetrametrina	96	8	3,84	0,95
Tiabendazol	105	11	5,27	0,88
Tiametoxam	95	8	4,75	1,19
Tralometrina	100	4	0,25	0,13

(1) Valor aceitável: 0 - 20% [15]

(2) Valor aceitável: 0 - 3,18 [18]

Os resultados de recuperação mostraram valores que variaram de 93 a 106%, com coeficientes de variação de 4 a 11% para os oito pesticidas estudados. O valor de *t* experimental para realização do teste *t-Student* foi calculado de acordo com a equação:

$$t_{\text{exp}} = \frac{(X_{\text{Rec}} - \mu)\sqrt{n}}{\text{SD}} \quad (1)$$

Onde: X_{Rec} é a média de recuperação do método, μ é o valor esperado (100%), n o tamanho da amostra (4) e SD o desvio padrão das médias de recuperação de cada nível de fortificação. O valor calculado de *t* para cada pesticida pode ser encontrado na Tabela 4 acima. O valor de *t* tabelado foi de 3,18 com 95% de confiança e três graus de liberdade. Como o valor experimental é menor que o valor tabelado, não é possível afirmar que existam diferenças significativas entre o valor esperado e o encontrado, evidenciando que o método proposto apresenta exatidão adequada.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método proposto foi considerado exato para investigação de pesticidas da soja em águas subterrâneas devido às excelentes recuperações e por não mostrar diferenças significativas entre a média das recuperações e o valor desejado, como determinado no cálculo estatístico empregando-se o teste *t* de *Student*. Este também foi considerado preciso devido aos baixos valores do coeficiente de variação, CV (%), estando todos os desvios-padrão relativos abaixo do limite estipulado para análise de resíduos de pesticidas (20%). O método utilizado constitui-se de duas etapas de preparação, uma por partição com solvente orgânico e outra por *clean-up* com florissil, além de análise por cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons. Conclui-se que a técnica pode ser utilizada no monitoramento de áreas sob investigação de pesticidas da soja em águas subterrâneas, com alto grau de confiabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] EMBRAPA SOJA. **Revista 30 anos: gerando tecnologias e cultivando parcerias**. Londrina, abril 2005.

[2] BRASIL. Leis, Decretos, etc. **Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins**. Brasília, Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, 1998. Disponível em: <<http://www.andef.com.br/legislacao/menu.htm>>. Acesso em: 17 julho 2008.

[3] BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. **Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins**, Brasília, Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, 1998. Disponível em: <<http://www.andef.com.br/legislacao/port84.htm>>. Acesso em: 17 julho 2008.

[4] DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Consulta Pública nº 34, de 30 de abril de 2002. **Diário Oficial da União**, nº 92, de 15 de maio de 2002.

[5] BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO. Jaguariúna: EMBRAPA, junho 2007. Edição 44.

[6] DE GIOVANNI, Carlos Alberto Ferraresi. IBAMA. Monitoramento Ambiental (Proposta de Projeto). **Determinação de índices de agrotóxicos presentes na área da unidade de conservação.** Parque Nacional das Emas. Goiás: 2005.

[7] DORES, E.F.G.C; Lamônica-Freire, E.M. Contaminação do Ambiente Aquático por Pesticidas. Estudo de Caso: Águas usadas para Consumo Humana em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar - **Química Nova**, Vol. 24, No. 1, 27-36, 2001.

[8] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR). **Toxicological Profile for Pyrethrins and Pyrethroids.** Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA: US, 2003.

[9] IUPAC Global availability of information on agrochemicals. **Pesticide Properties Database.** Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>>. Acesso em: 03 março 2009.

[10] OROS, D.R.; WERNER, I. Pyrethroid Inseticides: an analysis f use patterns, distributions, potential toxicity and fate in the Sacrameto-San Joaquin Delta and Central Valley. San Francisco Estuary Institute, Oakland, CA. **White Paper for the Interagency Ecological Program.** SFEI Contribution 415, 2005.

[11] CFR. Disponível em: <<http://www.ecfr.gpoaccess.gov>>. Acesso em: 17 março 2009.

[12] US EPA. SW 846 Method 3510C Separatory Funnel Liquid-liquid extraction , Revision 3, December 1996, 8p. Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em: 17 março 2009.

[13] US EPA. SW 846 Method 3620C Florisil Cleanup, Revision 3, February 2007, 27p. Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em: 17 março 2009.

[14] US EPA. SW 846 Method 8000C Determinative Chromatographic Separations, Revision 3, March 2003, 66p. USA: 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em: 17 março 2009.

[15] US EPA Division of Hazardous Waste Management. Tier I Data Validation Manual for Ohio EPA, Revision 4, February 2006, 124p. Disponível em: <<http://www.epa.state.oh.us/dhwm/pdf/TierIDVManual.pdf>>. Acesso em: 17 março 2009.

[16] VAN DER HOFF, G.R.; PELUSIO, F.; BRINKMAN, U.A.Th; BAUMANN, R.A.; VAN ZONEN, P. Automated solid-phase extraction coupled to gas chromatography with electron-capture detection: a combination of extraction and clean-up of pyrethroids in the analysis of surface water. **Journal of Chromatography A.**, vol. 719, No. 1, 59-67, 1996.

[17] BARRIONUEVO, W.R; LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, Vol. 24, No. 2, 172-175, 2001.

[18] LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.