USO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA A AVALIAÇÃO DE
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PESTICIDAS EM SOLOS.

III. DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO

FERNANDO M. LANÇAS*

JANETE H. YARIWAKE VILEGAS*

ROSANA F. VAZOLLER**

ALEXANDRE V. SAMPAIO**†

No presente trabalho propõe-se uma metodologia alternativa àquela descrita no Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos do IBAMA, para avaliação da biodegradação de agrotóxicos em amostras de solos. Utilizando-se a trifluralina como modelo, foi feita a avaliação da biodegradação deste agrotóxico em solo do Estado de São Paulo, a partir da detecção e determinação quantitativa da trifluralina por cromatografia gasosa de alta resolução com detecção por ionização de chama (HRGC/FID). Os resultados encontrados foram compatíveis com o comportamento da trifluralina em solos, determinado por métodos radiométricos e descrito na literatura para a trifluralina. A substituição do método convencional (radiométrico) pelo método cromatográfico pode ser uma alternativa mais econômica e mais conveniente para a realidade brasileira.

* Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

** Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

† in memoriam.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das técnicas de cultivo agrícola em larga escala tem levado à crescente utilização de pesticidas, os quais potencialmente oferecem riscos ao meio ambiente e ao homem. Muitos destes compostos podem sofrer acumulação ou modificações em vários tipos de ecossistemas, e este fato tem estimulado o estudo da detecção, monitoramento e toxicidade dos mesmos no meio ambiente. Deve-se lembrar que as substâncias orgânicas em geral, incluindo-se os pesticidas, ao entrar em contacto com o solo podem sofrer ataque microbiano, o que leva à degradação parcial ou total destas substâncias (1).

Órgãos como o Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA-USA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) incluem testes de biodegradabilidade *in vitro* como parte dos testes que permitem a avaliação do potencial comportamento de campo de um pesticida (2, 3). No caso brasileiro, o IBAMA prescreve o uso de métodos radiométricos para o monitoramento do comportamento de pesticidas em solos, pelo acompanhamento da mineralização do pesticida até CO₂ (2). Como inconveniente deste teste, deve-se destacar a necessidade de utilização de material radioativo, marcado com ¹⁴C, cuja meia-vida é superior a 5.000 anos e que oferece riscos potenciais no caso de manuseio ou descarte inadequado e/ou acidentes de laboratório; estes riscos em potencial são agravados pela condução do teste até a etapa de formação de ¹⁴CO₂, substância volátil e passível de ser incorporada por sistemas biológicos.

Outro inconveniente do teste de biodegradabilidade, conforme o procedimento indicado pelo IBAMA, é a necessidade de utilização de substâncias uniformemente radiomarcadas, isto é, na qual mais do que 99% dos átomos de carbono de todas as posições tenham sido substituídos por ¹⁴C. Esta exigência, na prática, representa um fator adicional de enorme aumento de custos e nas dificuldades de obtenção de

padrões adequados para muitos pesticidas. A maioria absoluta dos compostos radiomarcados são obtidos no Brasil apenas por importação, tendo o inconveniente adicional do alto custo.

Técnicas cromatográficas de alta resolução podem ser uma alternativa eficiente e segura para a realização de outros ensaios ligados à avaliação do comportamento de campo de pesticidas; um exemplo é a cromatografia gasosa de alta eficiência com detecção de captura de elétrons (HRGC/ECD), técnica adequada à execução de ensaios físico-químicos como os testes de adsorção e de mobilidade, também indicados pelo IBAMA para a avaliação de pesticidas (4, 5). Outras técnicas cromatográficas modernas, contudo, também podem ser utilizadas como alternativa aos métodos radiométricos, não somente nos referidos ensaios, mas também na avaliação da biodegradação de pesticidas. De particular interesse é o acoplamento entre métodos cromatográficos e espectrometria de massas (e.g., GC-MS) (6), que permite a separação e determinação da estrutura química não apenas do pesticida, como também de seus metabólitos, uma vez que não é incomum a formação de novos produtos no decorrer dos processos de biotransformação em solos (7).

O objetivo deste trabalho é apresentar a cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chama (HRGC/FID) como alternativa eficiente e segura aos métodos radiométricos, tendo como exemplo o teste de biodegradação de pesticidas.

Escolheu-se a trifluralina como modelo para esta avaliação por tratar-se de um pesticida amplamente comercializado e utilizado no país. Este pesticida pertence à classe das fluoronitroanilinas, é considerado quimicamente estável (mas instável frente à radiação UV), sendo utilizado como herbicida (8).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PESTICIDA ESTUDADO

Utilizou-se trifluralina, 99,7% de pureza, determinada por HRGC.

A trifluralina foi misturada diretamente ao solo, na forma sólida, ou foi utilizada em solução 80 g/mL em água destilada, conforme descrito no item 2.3.

2.2 SOLO

O solo foi coletado na região de São Carlos, SP e analisado pelo Laboratório de Solos da ESALQ-USP. O solo utilizado foi classificado como argiloso, com pH 4,65 e 4,13% de matéria orgânica.

As amostras de solo foram coletadas de um perfil de aproximadamente 20 cm de profundidade, desprezando-se a camada superficial de 2 cm. O solo foi seco a temperatura ambiente e posteriormente peneirado em malha de 2 mm.

2.3 ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO

Os ensaios foram conduzidos conforme a metodologia descrita pelo IBAMA (2), baseada em trabalhos da literatura (1, 9, 10), modificando-se exclusivamente a metodologia de detecção do pesticida.

Os ensaios foram realizados em duas concentrações diferentes de trifluralina, uma baixa (10 µg trifluralina/g solo) e uma concentração mais elevada (85 µg trifluralina/g solo). Para ambas as faixas de concentração, foram realizadas 5 repetições. Todos os ensaios foram conduzidos protegendo-se as amostras da luz, para evitar a degradação do pesticida pela radiação UV.

Para o ensaio à baixa concentração, amostras de solo (10 g cada, pesadas após reativação, vide item 2.3.2) foram colocadas em frascos de vidro, de boca larga e com tampa de polietileno revestida com teflon. Após uma semana de adaptação em estufa a 25°C, adicionou-se 1 mL da solução de trifluralina 80 µg/mL; após homogeneização, incubou-se a mistura solo/pesticida em estufa a 25°C.

Para o ensaio à alta concentração, 30 mg de trifluralina foram misturados à amostra de solo (350 g cada, pesadas após reativação), homogeneizando-se em almofariz. Alíquotas de 10 g foram colocadas em frascos idênticos aos utilizados no ensaio à baixa concentração; também incubou-se a mistura solo/pesticida em estufa a 25°C.

2.3.1 CONTROLE

Foi feito o controle do teste utilizado-se uma amostra de solo esterilizado em autoclave (121°C, 20 min), denominada amostra-controle, a qual foi submetida a procedimento idêntico ao das amostras de solo-teste. O controle foi realizado em triplicata.

2.3.2 REATIVAÇÃO DOS SOLOS

Preliminarmente, determinou-se a capacidade de campo do solo peneirado, seguindo-se a metodologia descrita na literatura (10). As amostras de solo foram reativadas com a adição de água equivalente a 2/3 da capacidade de campo, o que para as amostras utilizadas correspondeu a 19,35%. Após a reativação, os solos foram colocados para adaptação, em estufa a 25°C, e procedeu-se aos ensaios de biodegradação.

2.3.3 EXTRAÇÃO DO PESTICIDA DAS AMOSTRAS DE SOLO

As amostras de solo foram secas, com ar comprimido, dentro do próprio frasco utilizado para a condução do ensaio.

ós secagem, o solo foi pesado, homogeneizado e extraído em stema Soxhlet, com metanol p.a., durante 4 horas. O volume extrato obtido foi reduzido a 5 mL, em rotaevaporador a °C, sob vácuo. O extrato concentrado foi submetido a "clean-up", em microcoluna de sílica gel e eluição com tanol. O eluído foi dissolvido em metanol, para análise omatográfica.

As extrações foram feitas semanalmente em duplicata, rante 28 dias. A primeira extração (tempo = 0) foi efetuada mediatamente após a contaminação dos solos, conforme comendação do IBAMA (2). Após 8 semanas, foi realizada uma tração em triplicata do ensaio à alta concentração.

Todas as etapas de extração foram realizadas otegendo-se as amostras da luz, para evitar a degradação da ifluralina.

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As análises foram feitas em cromatógrafo SRI 8610, quipado com coluna LM-1 (20 m x 0,53 mm x 5 µm), com tector tipo FID (detector por ionização de chama) e injeção n column". A programação de temperatura da coluna foi 140°C . min), 140 - 220°C (6°C/min), 220 - 240°C (8°C/min). O gás arraste utilizado foi o hidrogênio, à pressão de 50 psi e uxo de 33 mL/min. A análise quantitativa do teor de ifluralina recuperada nas extrações foi feita pelo método padrão interno (curva de calibração). O pico orrespondente à trifluralina foi identificado por comparação tempo de retenção com amostra-padrão (autêntica) de ifluralina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio-controle efetuado com solo estéril, indica uma equena variação da concentração de trifluralina no solo recuperação de 82% após duas semanas e de 70,5% após oito

semanas), o qual pode ser atribuído à volatilidade da trifluralina. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por GOLAB (11) com trifluralina em diferentes solos. Deve-se destacar que o ensaio visava a mensuração da trifluralina no solo, mas que existem técnicas cromatográficas que alternativamente, se desejável, permitiriam a determinação quantitativa da trifluralina ausente do solo por evaporação, como a técnica de "headspace" (12).

Observou-se diminuição significativa da concentração do pesticida em ambos os ensaios, decorrente da atividade microbiana dos solos. O ensaio conduzido utilizando-se 85 µg trifluralina/g solo mostrou-se mais adequado a avaliação do decréscimo da concentração deste pesticida no solo (Tabela 1).

TABELA 1 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRIFLURALINA (EM PORCENTAGEM) EM FUNÇÃO DO TEMPO (VALORES DE σ PARA n MAIOR OU IGUAL A 3)

Tempo (semanas)	Recuperação (%)*	Desvio*
0	95,47	1,53
1	74,01	1,95
2	69,81	2,39
3	66,18	7,69
4	61,60	3,50
8	42,78	3,20

* Recuperação e Desvio calculados por, no mínimo, 5 tomadas.

A curva observada de decaimento do teor de trifluralina no solo apresenta comportamento similar ao observado para ensaios realizados com trifluralina radiomarcada (11) (Figura 1). Deve-se lembrar que devido à forte adsorção sofrida pela trifluralina em solos (4, 5), a possibilidade de degradação por processos químicos é reduzida.

RA 1 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRIFLURALINA EM FUNÇÃO DO TEMPO NO SOLO-CONTROLE E NA AMOSTRA DE SOLO-TESTE

A etapa de extração do pesticida em estudo fornece um rial adequado não somente à análise cromatográfica titativa, conforme realizado no presente trabalho, mas em adequado à ensaios cromatográficos (por exemplo, HRGC lada à espectrometria de massas) visando a identificação pesticida extraído do solo e a detecção da eventual ação de produtos de decomposição do mesmo. Sabe-se que os pesticidas podem decompor-se no solo, originando utos de degradação parcial, além do CO₂ oriundo da ralização (decomposição completa) (3); estes produtos rmediários eventualmente podem ser mais perigosos ao meio ente ou ao homem do que o pesticida de partida.

A EPA-USA considera a avaliação da biodegradabilidade um pesticida pela mineralização do mesmo como um teste .co, cujos resultados devem ser complementados com ensaios ionais. Dentre estes últimos, a EPA-USA recomenda a

determinação dos produtos de biodegradação remanescentes no solo, no caso de pesticidas considerados persistentes (substâncias cuja mineralização em 10 dias é menor ou igual a 50%). Recomenda-se ainda que seja feita a estimativa da evaporação do pesticida em estudo, no caso de pesticidas voláteis (3).

Para os ensaios de biodegradação, a HRGC/FID mostrou ser uma técnica adequada à análise quantitativa da trifluralina, apresentando boa linearidade e precisão nas análises nas concentrações do pesticidas utilizadas neste ensaio. A HRGC/ECD, utilizada em trabalhos anteriores como alternativa aos métodos radiométricos (4, 5), também pode ser utilizada e com desempenho comparável à HRGC/FID, neste ensaio.

5 CONCLUSÃO

O uso da HRGC permitiu a realização do teste de biodegradabilidade, conforme o protocolo descrito pelo IBAMA, eliminando os inconvenientes inerentes à utilização de material radiomarcado. O procedimento utilizado para o ensaio via HRGC apresenta a vantagem adicional de permitir, caso necessário, a análise e identificação de compostos de degradação intermediários, referentes à mineralização incompleta do pesticida em estudo, os quais não seriam avaliados pelo método radiométrico.

Abstract

In the present work, an alternative methodology to those described for the evaluation of biodegradability of pesticides in the IBAMA Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos is described. By using trifluralin as a model compound, the evaluation of biodegradability of this compound in a soil of São Paulo State, Brazil, was evaluated, using HRGC/FID for the detection and quantitative evaluation of the studied compound. The results herein described are compatible with those described in the literature for trifluralin. The exchange of the conventional (radiometric) method for the chromatographic method can be a more suitable and cheaper choice to the Brazilian conditions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 PRAMER, D., BARTHA, R. Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. Environ. Lett., v. 2, p. 217-224, 1972.
- 2 IBAMA. Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos: E.1 - Testes de Biodegradabilidade, Brasília, 1990.
- 3 EPA. Pesticides Assesment Guidelines - subdivision N: chemistry environmental fate. Washington, D.c., 1982.
- 4 LANÇAS, F.M., VILEGAS, J.H.Y., GALHIANE, M.S. Uso de técnicas cromatográficas para a avaliação de propriedades físico-químicas de pesticidas em solos. I. Determinação da adsorção/dessorção. Pesticidas R. Téc. Cient., v. 4, n. 4, p. 39-48, 1994.
- 5 LANÇAS, F.M., VILEGAS, J.H.Y., GALHIANE, M.S. Uso de técnicas cromatográficas para a avaliação de propriedades físico-químicas de pesticidas em solos. II. Determinação da mobilidade. Pesticidas R. Téc. Cient., v. 4, n. 4, p.49-56, 1994.
- 6 LANÇAS, F.M. Cromatografia em Fase Gasosa. São Carlos : Acta, 1993, 254 p.
- 7 HELENE, C.G., LORD, K.A., RÜEGG, E.F. The persistence, leaching and volatilization of ¹⁴C-aldrin in two Brazilian soils. Ciênc. Cult., v. 33, p. 101-105, 1981.
- 8 ROYAL CHEMICAL SOCIETY. The Agrochemical Handbook, 2nd. ed. Notthigham, 1987. p. A412.
- 9 KOUFMANN, D.D. Approaches to investigating soil degradation and dissipation of pesticides. In: WITT, J.M.; GILLET, J.W. (Eds). Terrestrial Microcosms and Environmental Chemistry. 1977. p. 41-53.
- 10 HILL, I.R., ARNOLD, D.J. Transformation of pesticides in the environment. The experimental approach. In : HILL, J.R.; WRIGHT, S.J.L. (Eds). Pesticide Microbiology: Microbial Aspects of Pesticide Behavior in the Environment. London : Academic Press. 1978, p. 203-345.
- 11 GOLAB, T., ALTHAUS, W.A., WOOTEN, H.L. Fate of [¹⁴C] trifluralin in soil. J. Agric Food Chem., v. 27, n. 1, p. 163-179, 1979.
- 12 JENNINGS, W., RAPP, A. Sample Preparation for Gas Chromatographic Analysis, Hüthig, Germany, 1983, 104 p.