

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**FITORREMEDIAÇÃO DE PESTICIDAS
UTILIZADOS EM LAVOURAS DE ARROZ
ATRAVÉS DO CULTIVO HIDROPÔNICO DE
ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anderson da Silva Rosa

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

ANDERSON DA SILVA ROSA

**FITORREMEDIAÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZADOS EM LAVOURAS DE
ARROZ ATRAVÉS DO CULTIVO HIDROPÔNICO DE ALFACE (*Lactuca
sativa* L.)**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs

Uruguaiana

2013

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R788f Rosa, Anderson da Silva
Fitorremediação de Pesticidas Utilizados em Lavouras de
Arroz Através do Cultivo Hidropônico de Alface (*Lactuca sativa*
L.) / Anderson da Silva Rosa.
122 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2013.
"Orientação: Rafael Roehrs".

1. fitorremediação. 2. pesticidas. 3. hplc. 4. alface. 5.
arroz. I. Título.

ANDERSON DA SILVA ROSA

FITORREMEDIAÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZADOS EM LAVOURAS DE
ARROZ ATRAVÉS DO CULTIVO HIDROPÔNICO DE ALFACE (*Lactuca
sativa L.*)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica.

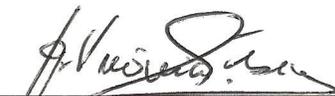
Área de concentração: Bioprospecção
Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 10 de dezembro de 2013.

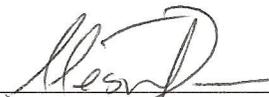
Banca examinadora:



Prof. Dr. Rafael Roehrs
Orientador
(UNIPAMPA)



Prof. Dr.ª María Verónica Cesio
(UDELAR)



Prof. Dr. Clesio Soldateli Paim
(UNIPAMPA)

Dedico esta dissertação à minha família que sempre me apoiou e que são os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, Renato e Lunalva por todo apoio e incentivo. Obrigado pelos ensinamentos e carinho, não existem palavras para descrever e agradecer tudo o que fizeram por mim. Vocês são os grandes responsáveis por esta conquista que hoje dedico a vocês.

Ao meu irmão Patrick pelo apoio e palavras de incentivo durante nossas conversas.

Aos meus avós, Loé e Laura, meu agradecimento pelo incentivo em todas as etapas desta caminhada.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Rafael Roehrs, pela oportunidade e confiança durante este mestrado. Agradeço pelo apoio, incentivo, ensinamentos e amizade. Serei sempre grato por tudo, com certeza tua orientação foi muito importante para que eu chegasse até aqui e para o que levarei desta experiência para minha vida, pois soubestes conduzir os trabalhos de forma sábia, justa e perfeita.

A Paola por ter me incentivado, apoiado e ouvido durante esta caminhada. Neoqav.

Aos professores Clesio, Fabiana e Verónica agradeço pela participação na banca e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Bruna e Malu, que me acompanharam neste trabalho em todos os momentos. Agradeço pela dedicação, trabalho, apoio e amizade tanto nos momentos bons quanto nos ruins. Vocês têm grande mérito neste trabalho que com certeza é uma conquista de vocês também. Esta é uma conquista dentre muitas que vocês ainda terão pela frente.

Aos meus colegas de trabalho da UNIPAMPA, e que de certa forma também foram meus colegas de mestrado, especialmente à Simone, Suzi, Jefferson, Cristiano e Luisa. Obrigado pela amizade, incentivo, ajuda, ensinamentos e principalmente pela paciência de me ouvirem nos momentos difíceis e de pessimismo. Sou grato por todos os momentos de convivência e por terem me apoiado para que conseguisse alcançar este objetivo.

Aos colegas do Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais, em especial, ao Jefferson e ao Professor Elton L.G. Denardin por todo o apoio e pela oportunidade de trabalhar no laboratório.

A todos os meus professores desde o ensino fundamental pelos ensinamentos, minha eterna gratidão. Em especial aos professores Cícero Alves, Luis Hugo Burin, Antonio Luiz Braga e Edgar Osório.

Por fim, e não menos importante, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica - PPGBioq e à UNIPAMPA por proporcionarem esta oportunidade.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Fundação Universidade Federal do Pampa

FITORREMEDIAÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZADOS EM LAVOURAS DE ARROZ ATRAVÉS DO CULTIVO HIDROPÔNICO DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

AUTOR: Anderson da Silva Rosa

ORIENTADOR: Rafael Roehrs

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 10 de dezembro de 2013.

Pesticidas são compostos sintéticos que possibilitam o aumento da produção e da qualidade dos produtos agrícolas através da diminuição das perdas geradas por organismos indesejados. No entanto, eles podem gerar um gradativo impacto ambiental devido a sua toxicidade. Resíduos de pesticidas e seus metabólitos têm sido frequentemente encontrados em águas subterrâneas e de superfície. Desta forma, a contaminação de corpos d'água pode afetar direta ou indiretamente a saúde humana e a integridade do ecossistema por induzir uma ameaça significativa em ambientes aquáticos e recursos de água potável. A descontaminação de águas contaminadas por pesticidas tem um custo elevado e envolve grande gasto de energia. A fitorremediação (o uso de plantas para descontaminação de compostos xenobióticos) ganhou popularidade como uma rentável, ambientalmente amigável e eficiente tecnologia *in situ* para uma variedade de poluentes e, entre eles, muitos pesticidas. O presente estudo avaliou o potencial de fitorremediação da alface (*Lactuca sativa* L.) em águas contendo uma mistura dos pesticidas quincloraque, 2,4-D, clomazone, propanil e tebuconazole na concentração de 50 µg/L através de cultivo hidropônico. Para tal fim, foi desenvolvido e validado um método multirresidual para a determinação destes pesticidas citados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) em água potável e de cultivo hidropônico. O método desenvolvido mostrou-se eficaz, confiável, com boa sensibilidade e repetibilidade para a determinação dos compostos de interesse. O método proporciona ainda, flexibilidade para incluir novos

pesticidas e/ou seus produtos de degradação. Para a avaliação da fitorremediação, mudas de alface foram cultivadas e após dez dias os meios de cultivo foram fortificados com os pesticidas em estudo. Foram coletadas amostras da água de cultivo no dia da fortificação, no sétimo e décimo-quarto dia após o tratamento. Houve uma diminuição significativa das concentrações de quincloraque, tebuconazole, 2,4-D e clomazone, sendo os melhores resultados obtidos após sete dias para os dois primeiros compostos e quatorze dias para os últimos, respectivamente. Esse estudo mostra o potencial do cultivo hidropônico de alface para a fitorremediação de pesticidas em água.

Palavras-chave: Pesticidas; HPLC; fitorremediação; alface.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Biochemistry Post-Graduation Program
Federal University of Pampa

**PHYTOREMEDIATION OF PESTICIDES USED IN RICE CROPS USING
CULTURE HYDROPONIC LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)**

AUTHOR: ANDERSON DA SILVA ROSA

ADVISOR: RAFAEL ROEHRS

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, December 10th, 2013.

Pesticides are synthetic compounds that enable an increased production and quality of agricultural products by reducing losses caused by unwanted organisms. However, they can generate a gradual environmental problem due to their toxicity. Pesticide residues and their metabolites have often been found in groundwater and surface. Thus, the contamination of water bodies may directly or indirectly affect human health and the ecosystem integrity by inducing a significant threat to aquatic environments and drinking water resources. The decontamination of water contaminated by pesticides is expensive and involves great expenditure of energy. The phytoremediation (the use of plants to decontaminate xenobiotics) has gained popularity as a low cost, environmentally friendly and efficient *in situ* technology for a variety of pollutants and, among them, many pesticides. The present study evaluated the potential for phytoremediation of lettuce to water containing a mixture of pesticides quinclorac, 2,4-D, clomazone, propanil and tebuconazole concentration of 50 µg/L through hydroponics. Therefore, a multiresidue method for determination of pesticides cited by high performance liquid chromatography, with diode array detection (HPLC-DAD), in drinking water and hydroponic medium was developed and validated. The method has proven effective, reliable with good sensitivity and reproducibility for determining the compounds of interest. The method provides further flexibility to add new pesticide and/or its degradation products. For the evaluation of phytoremediation lettuce seedlings were grown and after ten days, the culture media was fortified with the

pesticides under study. Water samples were collected from cultivation on fortification, on the 7th and 14th days after treatment. It was observed a significant decrease in concentrations of quinclorac, tebuconazole, clomazone and 2,4-D, and the best results were obtained after seven days for the first two compounds and for the past fourteen days, respectively. This study shows the potential of hydroponic cultivation of lettuce for phytoremediation of pesticides in water.

Keywords: Pesticides; HPLC; phytoremediation; lettuce.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E RESULTADOS E DISCUSSÕES

Figura 1. Área semeada e produtividade 2009/2010.	23
Figura 2. Fórmula Estrutural do Quincloraque.....	29
Figura 3. Fórmula estrutural do bentazone	30
Figura 4. Fórmula estrutural do 2,4-D	31
Figura 5. Fórmula estrutural do Clomazone	32
Figura 6. Fórmula estrutural do propanil.....	33
Figura 7. Estrutura química do tebuconazole.	34
Figura 8. Estrutura do Tebuconazol e seus produtos de degradação.....	36
Figura 9. Etapas da extração por SPE.....	39
Figura 10. Processo de fortificação de amostras para validação de métodos analíticos.	45
Figura 11. Principais processos propostos para hiperacumulação de metais pesados por plantas.....	51
Figura 12. Reações catalisadas por enzimas responsáveis pela desintoxicação de xenobióticos em plantas.	53
Figura 13. Rota de metabolismo do quincloraque em <i>leafy spurge</i>	54
Figura 14. Rota de biodegradação do quincloraque por <i>B. cepacia</i> WZ1.	55
Figura 15. Metabólitos dos herbicidas 2,4-D e bentazone.	55
Figura 16. Rota proposta de biotransformação para o clomazone em arroz e milhã	56
Figura 17. Metabolismo do propanil em plantas.	57
Figura 18. Lavoura convencional de alface.....	58
Figura 19. Cultivo hidropônico de alface.	59
Figura 20. Estrutura química dos pesticidas utilizados no cultivo de alface.	60
Figura 21. Estrutura do material de recheio dos cartuchos Strata C18 ® e Strata X ®...94	
Figura 22. Plantas de Alface na primeira semana da aplicação dos pesticidas.	95
Figura 23. Necrose de folhas após a segunda semana da aplicação dos pesticidas.....	96
Figura 24. Cromatograma de amostra de água com nutrientes fortificada com pesticidas sem o cultivo de alface.....98	
Figura 25. Cromatograma de amostra de água com nutrientes fortificada com pesticidas com o cultivo de alface.....99	

ARTIGO 1

Figure 1. Chromatograms: (a) standard 5 mg/L, (b) extraction Strata C18 in water, (c) extraction hydroponics water.....	75
---	----

ARTIGO 2

Figure 1. Recovery (%) of five pesticides evaluated.....	85
Figure 2. Chromatogram of sample without lettuce collected on the 14 th day.....	88
Figure 3. Chromatogram of sample with lettuce collected on the 14 th day.....	89

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 1. Herbicidas recomendados para a lavoura de arroz.....	25
Tabela 2. Dose do fungicida tebuconazol recomendada para o cultivo de arroz irrigado.....	27
Tabela 3. Ingestão diária aceitável dos pesticidas avaliados.....	28
Tabela 4. Limite máximo permitido para águas envasadas e gelo.....	28
Tabela 5. Estratégias de fitorremediação.....	49
Tabela 6. Enzimas vegetais e microbianas com papel na degradação de compostos orgânicos.....	52

ARTIGO 1

Table 1. Retention times for each pesticide studied.....	71
Table 2. Parameters for analytical curves and LOD and LOQ for method in hydroponic water medium.....	72
Table 3. Recovery and RSD at 5.0, 50.0 and 100.0 µg/L fortification levels in water.....	74
Table 4. Recovery and RSD at 5.0, 50.0 and 100.0 µg/L fortification levels in cultivation water.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{14}C – Isótopo carbono 14.

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, herbicida

3,4-DCA – 3,4-dicloro-anilina, principal metabólito do herbicida propanil

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AchE – Acetilcolinesterase

As – Arsênio

AT – Transportador de xenobióticos aniônicos dependentes de ATP

ATP – Adenosina trifosfato

CAS – *Chemical Abstracts Service*

Cd – Cádmi

cm – Centímetro

Co – Cobalto

Cu - Cobre

C_s – Concentração do analito

CT – Transportador glutationa-conjugado

CYP51 – Lanosterol 14 α -demetilase

DAD – Detector por arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detection*

DL₅₀ – Dose letal 50%

EC – Emulsão concentrada

ECD – Detecção por captura de elétrons, do inglês *electron capture detector*

EW – Emulsão óleo em água

EWG – Milhã, do inglês *xxx water grass*

GC – Cromatografia a gás, do inglês *Gas Chromatography*

GSTs – Glutathione S transferases

GT – Transportador glicosídeo conjugado dependente de ATP

GTs – Glucosil transferases

g/Kg – Grama por quilograma

g/L – Grama por litro

HPLC – Cromatografia a líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-DAD – Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector por arranjo de diodos

h_n – Maior desvio da linha base medido no tempo de retenção do analito numa faixa de $10 W_h$.

h_s – Altura do pico do analito

IDA – Ingestão diária aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IRGA – Instituto Rio Grandense do Arroz

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *Union International of Pure and Applied Chemistry*

Kg/ha – Quilograma por hectare

K_{ow} log P – Coeficiente de partição octanol-água

LC-MS – Cromatógrafo a líquido com detector por espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography with mass spectrometry detector*

LLE – Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

L/ha – Litro por hectare

L/s.ha – Litro por segundo por hectare

m^3/ha – Metro cúbico por hectare

$\mu\text{g/L}$ – Micrograma por litro

Mn - Manganês

MS – Espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

NA – Não avaliado

NC – Não confirmado

NE – Não especificado

Ni - Níquel

NPD – Detecção de nitrogênio e fósforo, do inglês *nitrogen-phosphorus detector*

Pb - Chumbo

pH – Potencial hidrogeniônico

PÓS (REST) – Pós-emergência restrita a cultivares de arroz com tolerância

PRÉ (REST) – Pré-emergência restrita a cultivares de arroz com tolerância

PRÉ (SEM) – Pré-semeadura e pós-emergência de plantas daninhas

pKa – Potencial de constante de ionização ácida

p.c – Produto comercial

r – Coeficiente de correlação

rec - Recuperação

r² – Coeficiente de determinação

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

R (%) – Porcentagem de recuperação

SC – Suspensão concentrada

Se - Selênio

SL – Concentrado solúvel

SPE – Extração por fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado

UV – Ultravioleta

VP – Peptidase vacuolar, do inglês *vacuolar peptidase*

WG – Granulado dispersível

W_H – Altura do pico de meia altura

WP – Pó molhável

Zn – Zinco

(M?) – Possível transformação microbiana

(R) – Arroz, do inglês *rice*

Sumário

RESUMO.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 USO DE PESTICIDAS E A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	22
2.2. PROBLEMÁTICA REGIONAL: A CULTURA DE ARROZ E O USO DE PESTICIDAS	22
2.3 PESTICIDAS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO.....	24
2.3.1 QUINCLORAQUE	29
2.3.2 BENTAZONE	30
2.3.3 2,4-D	31
2.3.4 CLOMAZONE	32
2.3.5 PROPANIL	33
2.3.6 TEBUCONAZOLE	34
2.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS	36
2.4 PREPARO DE AMOSTRAS EMPREGANDO SPE PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MATRIZES AQUOSAS	38
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	40
2.6.1 SELETIVIDADE	41
2.6.2 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE	42
2.6.3 SENSIBILIDADE	43
2.6.4 LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	43
2.6.5 EXATIDÃO.....	44
2.6.5.1 RECUPERAÇÃO	45
2.6.6 PRECISÃO.....	46
2.6.6.1 REPETITIVIDADE	46
2.6.6.2 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	47
2.6.6.3 REPRODUTIBILIDADE	47
2.6.7 EFEITO DA MATRIZ	47
2.7 FITORREMEDIÇÃO.....	48
2.8 ALFACE.....	57
3. OBJETIVOS.....	62
3.1 OBJETIVO GERAL	62

3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4.	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	63
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1	64
4.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2	78
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	94
7.	CONCLUSÃO.....	101
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	102
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
10.	ANEXOS.....	115
	ANEXO 1. HERBICIDAS RECOMENDADOS PARA A CULTURA DE ARROZ.....	116
	ANEXO 2. PESTICIDAS RECOMENDADOS PARA A CULTURA DE ARROZ, CONTINUAÇÃO...	117
	ANEXO 3. HERBICIDAS RECOMENDADOS PARA A CULTURA DE ARROZ, CONTINUAÇÃO.	118
	ANEXO 4. MECANISMOS DE AÇÃO, GRUPOS QUÍMICOS E NOMES COMERCIAIS DE RECOMENDADOS PARA ARROZ IRRIGADO.....	119
	ANEXO 5. FUNGICIDAS RECOMENDADOS PARA A CULTURA DE ARROZ IRRIGADO.	120
11.	APÊNDICES	121

1. INTRODUÇÃO

O intensivo uso agrícola de pesticidas pode levar a um risco significativo para organismos não-alvo dentro dos ecossistemas aquáticos e terrestres adjacentes (DOSNON-OLETTE *et al.*, 2009).

O uso indiscriminado de pesticidas resulta no excesso destes no meio ambiente, comprometendo assim a qualidade da água, e conseqüentemente a saúde pública. Considerando ainda que a grande maioria deles é tóxica (cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios) podendo acumular-se no organismo de animais e do ser humano, estando associados a diversas doenças (SILVA e FAY, 2004).

Resíduos de pesticidas e seus produtos de transformação são frequentemente encontrados em águas subterrâneas e de superfície (ÖNNEBY *et al.*, 2009).

O cultivo de arroz irrigado é uma das mais importantes culturas agrícolas desenvolvidas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (PRIMEL *et al.*, 2007). O arroz é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo. É o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupando área aproximada de 158 milhões de hectares. A produção de cerca de 662 milhões de toneladas de grãos em casca corresponde a 29% do total de grãos usados na alimentação humana (SOSBAI, 2010).

O Brasil está entre os dez principais produtores de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas para um consumo de 11,357 milhões de toneladas nas safras 2009/2010. A região sul é responsável por 60% da produção, o que equivale a sete milhões de toneladas. Dentro da região sul, o Estado que mais produz arroz é o Rio Grande do Sul, com uma produção de mais de 6 milhões de toneladas das safras de 2009/10 (SOSBAI, 2010).

A produção de arroz irrigado depende, em parte, da aplicação de pesticidas destacando-se os herbicidas que podem ser transportados para fontes de água gerando poluição e riscos ao meio ambiente e ao ser humano.

Os recursos hídricos são os mais afetados devido à agricultura exigir um suprimento de água, o que conduz ao desenvolvimento dessa atividade próxima a rios e lagos. O manejo de água é de fundamental importância para o sucesso na produção de arroz irrigado, uma vez que existe uma interação irrigação/cultivo. A água é um dos fatores mais importantes na produção de arroz, pois influencia nas características da

planta, nas condições nutricionais do solo, regula a temperatura e controla as plantas daninhas, minimizando os problemas com doenças e insetos.

Para prevenir problemas de contaminação da água por pesticidas, os países da Comunidade Europeia adotam como concentração máxima admissível $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ por composto na água potável sem, no entanto, ultrapassar $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ao considerar a soma de todos os compostos, incluindo produtos de transformação tóxicos e para águas de superfície, o limite máximo permitido é da ordem de 1 a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (CERDEIRA, 2002; EEC, 1980; SLOBODNÍK, 1997).

No Brasil, existe regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina a concentração máxima de alguns pesticidas em águas envasadas e gelo (BRASIL, 2005). Esta será apresentada em maiores detalhes posteriormente na revisão bibliográfica.

A descontaminação de águas contaminadas por pesticidas tem custo elevado e envolve grande gasto de energia. A fitorremediação (o uso de plantas para descontaminação de compostos xenobióticos) ganhou popularidade como uma rentável, ambientalmente amigável e eficiente tecnologia *in situ* para uma variedade de poluentes e, entre eles, muitos pesticidas. Nessa tecnologia são empregados processos naturais pelos quais as plantas e a flora microbiana, presente na rizosfera¹, degradam e sequestram poluentes orgânicos e inorgânicos. Em geral, para utilizar plantas como fitorremediadores, é preciso que elas tenham crescimento rápido, elevada produção de biomassa e vigor e tolerância à poluição (LAMEGO e VIDAL, 2007).

Em trabalhos anteriores, a alface (*Lactuca sativa L.*) mostrou fitoacumular Cádmio (Cd) quando submetida à irrigação com água contendo este metal pesado (AZIZIAN *et al.*, 2011).

Considerando fatores como o caráter imprescindível da água para a vida na terra, a importância do uso de pesticidas para atender a crescente demanda mundial por alimentos, a consequente possibilidade destes pesticidas contaminarem o meio ambiente e o homem, e ainda, a ausência de estudos sobre fitorremediação de xenobióticos orgânicos pela alface, os objetivos deste trabalho foram: (I) desenvolver e validar um método multirresidual para a análise de pesticidas com amplo uso em cultivos de arroz por HPLC-DAD utilizando extração por fase sólida, do inglês SPE; (II) avaliar o

¹ Região do solo submetida a influencia das raízes dos vegetais e caracterizada por ser uma zona de intensa atividade microbiana.

potencial de fitorremediação através do cultivo hidropônico de alface para descontaminação de águas contaminadas com uma mistura de pesticidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uso de Pesticidas e a Problemática Ambiental

Os pesticidas são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, micro-organismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar. No entanto, alguns destes processos são comuns a todos os seres vivos, e assim, o efeito pode então atingir não somente o organismo que se espera controlar, como também outros seres vivos.

Originalmente, os pesticidas eram estáticos, possuíam baixa solubilidade e tinham um forte poder de adesão as partículas do solo. Com a evolução tecnológica, estes compostos passaram a ser mais solúveis em água, a possuir baixa capacidade de adesão e ser mais voláteis. Essas inovações tecnológicas, que eram baseadas na manipulação de compostos químicos, criaram pesticidas cada vez mais tóxicos, persistentes e eficazes para combater as pragas da agricultura. Conseqüentemente, estas alterações tecnológicas nas características químicas destes compostos aumentaram e prolongaram ainda mais o potencial nocivo dos pesticidas de causar danos à saúde humana e ao meio ambiente (VEIGA, 2006).

Os pesticidas podem gerar impacto ambiental com efeitos causados por determinada substância que dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade para organismos terrestres e aquáticos. Além disso, depende diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, depende do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do pesticida no meio ambiente (ROCHA *et al.*, 2004; SPADOTTO, 2004).

2.2. Problemática Regional: A Cultura de Arroz e o Uso de Pesticidas

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta da família das *Poaceae* que alimenta mais da metade da população humana no mundo (EMBRAPA, 2010).

O arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo, sendo ultrapassado apenas pelo milho (SOSBAI, 2010). O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas, sendo a região sul responsável por 70% da produção nacional e tendo o estado do Rio Grande do Sul como maior estado produtor (SOSBAI, 2010).

No Rio Grande do Sul, o arroz é produzido em 133 municípios localizados na metade sul do Estado, onde 232 mil pessoas vivem direta ou indiretamente da exploração dessa cultura (SOSBAI, 2010).

O manejo da água da lavoura de arroz está relacionado ao sistema de cultivo utilizado. O Rio Grande do Sul caracteriza-se pelo cultivo de grandes áreas de arroz, onde predomina o sistema de cultivo com taipas em nível. A irrigação, na grande maioria das lavouras, é pouco planejada, embora se tenha o domínio da água. A inundação ocorre a partir de patamares mais altos, sendo a água conduzida por gravidade, mantendo-se uma lâmina de água através de taipas construídas com diferença de nível de 5 a 10 cm (SOSBAI, 2010).



Figura 1. Área semeada e produtividade 2009/2010. Fonte: IRGA, SOSBAI, 2010.

Para suprir a necessidade de água do arroz, estima-se que venha sendo utilizado, atualmente, um volume de água médio de 8 a 10 mil m³/ha (vazão de 1,0 a 1,4 L/s.ha), para um período médio de irrigação de 80 a 100 dias (SOSBAI, 2010).

A cultura de arroz irrigado está em 9º lugar dentre as culturas que mais utilizam pesticidas no Brasil e em nível mundial. As vendas de pesticidas para a cultura de arroz correspondem a 13% do total (BARBOSA, 2004).

2.3 Pesticidas selecionados para este estudo

Dentre os pesticidas recomendados para o cultivo de arroz irrigado (SOSBAI, 2010), foram avaliados neste trabalho os pesticidas quincloraque, bentazone, 2,4-D, Clomazone, propanil e tebuconazole.

A tabela 1 mostra os valores recomendados para cada um dos herbicidas em estudo enquanto na tabela 2 estão os valores para o tebuconazole que é um fungicida.

A tabela 3 mostra os valores de ingestão diária aceitável (IDA) para os seis pesticidas em questão conforme dados da ANVISA (2013). Na tabela 4 é apresentado o limite de concentração dos pesticidas avaliados, que tem a sua concentração máxima em águas envasadas e gelo definidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005).

Abaixo uma breve descrição dos pesticidas, características físico-químicas e sua toxicologia.

Tabela 1. Herbicidas recomendados para a lavoura de arroz. Adaptado de SOSBAI, 2010.

Ingrediente ativo	Produto comercial (p.c.)	Formulação² e concentração (g L⁻¹ ou Kg⁻¹)	Dose (p. c.) (Kg ou L/ha)	Época/mo de aplicação³	Classe Toxicológica⁴	Classe Ambiental⁵	Intervalo de segurança (dias)
Bentazone	Basagran 600 ^b ®	SL 600	1,2 -1,6	Pós	III	III	60
clomazone	Gamit ®	EC 500	0,8 – 1,4	Pré	II	II	NE ⁷
2,4-D ⁸	Aminol 806 ®	SL 806	0,5 – 1,5	Pós	I	III	NE
	DMA 806 BR®	SL 806	0,3	Pós	I	III	NE
	Herbi D-480 ®	SL 480	0,8 – 2,5	(Pré)/Pós	I	NA	NE
	U 46 D – Fluid ®	SL 720	0,3	Pós	I	III	NE
	2,4 – D ®						
	Deferon ®	EC 502	0,6 – 1,2	(Pré)/Pós	II	NA	NE
propanil	Grassaid ®	EC 360	8,0– 10,0	Pós	II	II	80

² SC = suspensão concentrada; SL = concentrado solúvel; EC = emulsão concentrada; EW = emulsão óleo em água; WG = granulado dispersível; WP = pó molhável;

³ Pré = pré-emergência; Pós = pós-emergência; Pré (sem) = pré-semeadura do arroz e pós-emergência das plantas daninhas; Pré (rest.)/Pós (rest.) = pré/pós emergência restrita a cultivares de arroz com tolerância;

⁴ I = extremamente tóxico; II = altamente tóxico; III = medianamente tóxico; IV = pouco tóxico;

⁵ I = produto altamente perigoso; II = produto muito perigoso; III = produto perigoso; IV = produto pouco perigoso; NA = não avaliado;

⁶ Adicionar Assist na dose de 1 L/há nas aplicações terrestres e 300 mL/há nas aplicações aéreas;

⁷ NE = não especificado devido ao modo de aplicação.

⁸ Utilizar preferencialmente a menor dose, devido ao risco de toxicidade ao arroz.

Ingrediente ativo	Produto comercial (p.c.)	Formulação² e concentração (g L⁻¹ ou Kg⁻¹)	Dose (p. c.) (Kg ou L/ha)	Época/modo de aplicação³	Classe Toxicológica⁴	Classe Ambiental⁵	Intervalo de segurança (dias)
	Herbipropanin ®	EC 360	8,0 – 10,0	Pós	I	II	80
	Propanil Fersol 360 ®	EC 360	10,0	Pós	II	II	80
	Propanil Milênia ®	EC 360	8,0 – 12,0	Pós	I	II	80
	Stam 360 ®	EC 360	10,0	Pós	I	II	80
	Stam 480 ®	EC 480	7,5 – 10,0	Pós	I	II	80
Propanil + thiobencarb	Grassmax ®	EC 470 + 200	5,0 – 6,0	Pós	IV	I	80
	Satanil EC ®	EC 200 + 400	6,0 – 8,0	Pós	III	II	80
Propanil + triclopyr	Stampir BR ®	EC 380 + 55,6	6,0 – 10,0	Pós	IV	I	80
quincloraque	Facet ⁹ ®	WP 500	0,75	Pós	III	III	90

⁹ Adicionar Assist na dose de 1 L/ha.

Tabela 2. Dose do fungicida tebuconazol recomendada para o cultivo de arroz irrigado. Adaptado de SOSBAI, 2010.

Nome Comercial	Nome Técnico	Grupo Químico	Modo de Ação	Formulações Concentrações (g de i.a./Kg ou L)	Dose P.C./há (Kg ou L)¹⁰	Doenças Controladas (Conforme registro)
Nativo	Trifloxistrobina + tebuconazol	Estrobilurina + triazol	Mesostêmico/Sistêmico	SC ¹¹	0,5 – 0,75	Mancha parda.

¹⁰ P.C. produto comercial;

¹¹ SC = suspensão concentrada;

Tabela 3. Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos Pesticidas avaliados. Fonte: ANVISA, 2013.

Pesticida	IDA¹² (mg/Kg pc¹³)
Bentazone	0,1
Clomazone	0,04
2,4-D	0,01
Propanil	n.c ¹⁴
Quincloraque	n.c ¹⁵
Tebuconazol	0,03

Tabela 4. Limite máximo permitido para águas envasadas e gelo. Fonte: ANVISA, 2005.

Pesticida	Limite Máximo Permitido (µg/L)
Bentazone	300
2,4-D	30
Propanil	20

¹² Ingestão Diária Aceitável

¹³ pc = peso corporal

¹⁴ n.c = Não consta IDA na sua monografia registrada na ANVISA disponível no site.

¹⁵ n.c = Não consta IDA na sua monografia registrada na ANVISA disponível no site.

2.3.1 Quincloraque

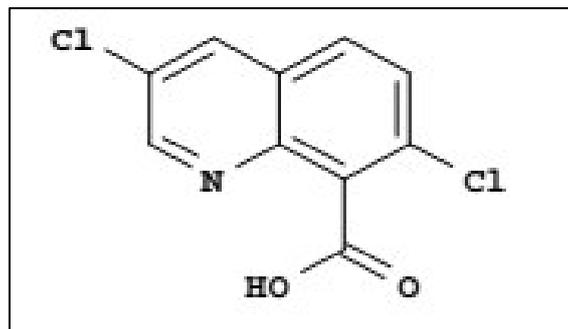


Figura 2. Fórmula Estrutural do Quincloraque

Classe: herbicida

Grupo químico: quinolinas

Nome químico (IUPAC): ácido 3,7-dicloroquinolina-8-carboxílico

Número no CAS: 84087-01-4

Fórmula molecular: $C_{10}H_5Cl_2NO_2$

Massa molar: 242,1 g/mol

pKa: 4,34 (20 °C)

K_{OW} log P: -1,15 (pH= 7,0)

Solubilidade em água: 0,065 mg/kg (pH= 7,0, 20 °C)

Classe toxicológica: Classe III (medianamente tóxico).

DL₅₀ oral – ratos machos: 2680 mg/Kg.

Intervalo de segurança para a cultura de arroz: 90 dias.

Nome comercial: Facet ®.

O quincloraque é um herbicida considerado altamente seletivo, utilizado no cultivo de arroz contra ervas daninhas mono e dicotiledôneas, principalmente o chamado capim-arroz (GROSSMANN, 1998). Este pesticida é registrado no Brasil para a cultura de arroz e para o controle de plantas daninhas em pós-emergência (ANVISA, 2013).

Vários estudos mostraram efeitos adversos em hidrófitas, animais aquáticos e até danos ao fígado e rins de mamíferos (CEREJEIRA *et al.*, 1998). Assim, resíduos do herbicida no ambiente, solo, água, etc..., oferecem um risco potencial ao ambiente.

Trabalhos recentes relatam que a formulação comercial contendo quincloraque e metil-metsulfuron, em concentrações iguais às recomendadas para o cultivo de arroz, inibiu a enzima acetilcolinesterase e induziu alterações bioquímicas em tecidos de piava (*Leporinus obtusidens*) como redução das propriedades antioxidantes da catalase, porém, não causando peroxidação lipídica (PRETTO *et al.*, 2011).

2.3.2 Bentazone

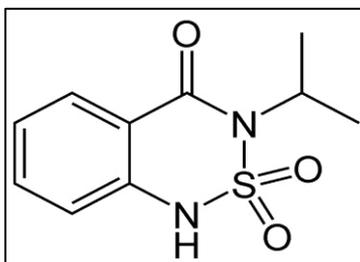


Figura 3. Fórmula estrutural do bentazone

Classe: Herbicida

Grupo químico: Benzotriazinona

Nome químico (IUPAC): 3-isopropil-1H-2,1,3-benzotriazin-4(3H)-ona 2,2-dióxido

Número no CAS: 25057-89-0

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂N₂O₃S

Massa molar: 247,32

pKa: 3,3 (24 °C)

Classe toxicológica: III

DL₅₀ oral – ratos machos: 1100 mg/kg

Intervalo de segurança para a cultura de arroz: 60 dias.

Nome comercial: Basagran 600 ®.

O bentazone é um pesticida do grupo das benzotriazinonas, e é um dos pesticidas mais utilizados ao redor do mundo. Possui efeito negativo sobre a pele e olhos nos seres humanos.

Na agricultura sua atuação ocorre bloqueando a fotossíntese em espécies de plantas dicotiledôneas através da inibição da cadeia de transporte de elétrons (HUBER e OTTO, 1994).

Recentemente o bentazone vem sendo encontrado presente em águas de superfície e subterrâneas (STREAT e HORNER, 2000).

2.3.3 2,4-D

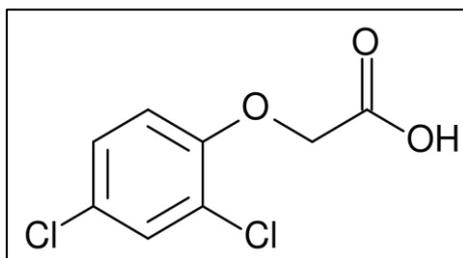


Figura 4. Fórmula estrutural do 2,4-D

Classe: Herbicida

Grupo químico: Ácido ariloxialcanóico

Nome químico (IUPAC): Ácido 2,4-diclorofenóxiacético.

Número no CAS: 94-75-7

Fórmula molecular: $C_8H_6Cl_2O_3$

Massa molar: 221,04 g/mol

pKa: 2,73

Classe toxicológica: I

Intervalo de segurança para a cultura de arroz: NE

Nomes comerciais: Aminol 806 ®, DMA 806 BR ®, Herbi D-480 ®, U 46

D Fluid ®, 2,4-D ®, Deferon ®.

O 2,4-D é um herbicida da família do ácido fenoxiacético ou fenoxi que é utilizado em pós-emergência para controle seletivo de ervas daninhas de folha larga. O 2,4-D é aprovado para uso em uma grande variedade de alimentos incluindo arroz, frutas e hortaliças.

Em estudos de longo prazo, em concentrações acima do *clearance* renal (depuração renal) o 2,4-D mostrou toxicidade aos olhos, tireóide, rins, testículos e ovários. Em coelhos causou decréscimo de atividade motora e abortos (EPA, 2005).

Ambientalmente, este herbicida possui baixa biodegradabilidade e é frequentemente encontrado em rios e cursos d'água (CHINGOMBE *et al.*, 2006). Outros estudos dos efeitos ambientais deste herbicida mostram que ele é tóxico para invertebrados aquáticos, fitoplâncton e peixes (CHENEY *et al.*, 1997; QUE-HEE, 1981; ROBLES-GONZÁLEZ *et al.*, 2006; SANDERS, 1969; VILLALOBOS *et al.*, 1996). Em outro estudo foi mostrado que espécies de piava (*L. Obtusidens*) em doses de 10 mg/L afeta a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculos e parâmetros metabólicos no sangue e alguns tecidos (FONSECA *et al.*, 2008).

2.3.4 Clomazone

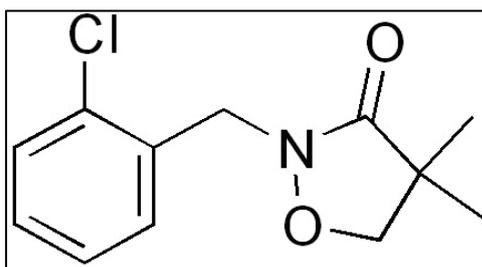


Figura 5. Fórmula estrutural do Clomazone

Classe: Herbicida

Grupo químico: Isoxazolidinona

Nome químico (IUPAC): 2-(2-clorobenzil)-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona

Número no CAS: 81777-89-1

Fórmula molecular: C₁₂H₁₄ClNO₂

Massa molar: 239,70 g/mol

pKa: Não se dissocia.

Solubilidade em água: 1102 mg/L (20 °C).

Classe toxicológica: II

DL₅₀ oral – ratos machos: 2,077 mg/Kg.

Intervalo de segurança para a cultura de arroz: NE.

Nome comercial: Gamit ®.

O clomazone é um herbicida de amplo espectro usado para o controle de gramíneas anuais e plantas daninhas de folha larga em algodão, ervilhas, abóbora, soja, batata-doce, tabaco, trigo e arroz. Ele pode ser aplicado no pré-plantio e pré-emergência dependendo do caso.

O herbicida clomazone atua como um inibidor da síntese de pigmentos fotossintéticos e outras substâncias importantes em plantas superiores (FERHATOGLU e BARRETT, 2006).

2.3.5 Propanil

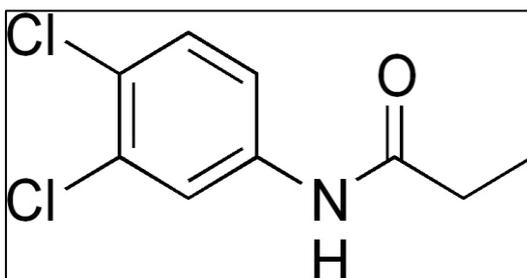


Figura 6. Fórmula estrutural do propanil

Classe: Herbicida

Grupo químico: anilidas.

Nome químico (IUPAC): 3,4-Dicloropropanilida

Número no CAS: 709-98-8

Fórmula molecular: C₉H₉Cl₂NO

Massa molar: 218,1 g/mol

pKa: Não se ioniza.

Solubilidade em água: 130 mg/l (25 °C)

Classe toxicológica: II

Nomes comerciais: Grassaid ®, herbipropanin ®, propanil ferson 960 ®, propanil milênia ®, stam 360 ®, stam 480 ®, grassmax ® (propanil + tiobencarb), stampir br ® (propanil + triclopir).

O Propanil (3,4-dichloropropionanilida) é um herbicida do grupo amida extensivamente usado no cultivo de arroz como um controle seletivo de pós-emergência de amplo espectro para ervas daninhas. Herbicidas amidas são herbicidas inibidores da fotossíntese sendo o propanil um forte inibidor da reação de Hill (CORSINI *et al.*, 2007) *apud* (Yih et al., 1968), a reação iniciada pela luz que divide a água, resultando na produção de oxigênio livre nas plantas.

No ambiente, o propanil possui uma meia-vida de um a três dias, sendo rapidamente degradado a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) que é uma molécula altamente tóxica. É um herbicida pós-emergente seletivo de curta duração usado na inibição do transporte de elétrons fotossintéticos em plantas de folhas largas (ROEHRS *et al.*, 2012).

O propanil pode ser absorvido pelo organismo através do trato respiratório, do aparelho digestivo e da pele intacta (CORSINI *et al.*, 2007) *apud* (Exttoxnet, 1993). Após a absorção pelos mamíferos, o propanil é rapidamente hidrolisado, especialmente a 3,4-DCA, pela enzima hepática acilamidase (CORSINI *et al.*, 2007).

2.3.6 Tebuconazole

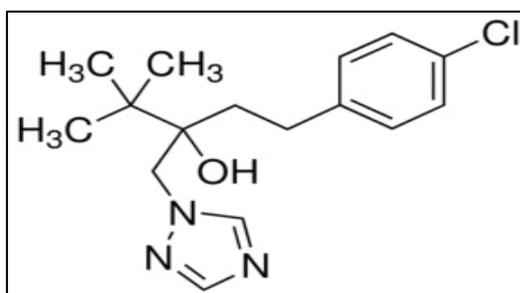


Figura 7. Estrutura química do tebuconazole.

Classe: Fungicida

Grupo químico: triazol

Nome químico (IUPAC): (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol

Número no CAS: 107534-96-3

Fórmula molecular: C₁₆H₂₂ClN₃O

Massa molar: 307,8 g/mol

pKa: nenhum

K_{OW} log P: 3,7 (20 °C)

Solubilidade em água: 36 mg/L (pH 5-9 , 20 °C)

Classe toxicológica: III (medianamente tóxico)

DL₅₀ oral – ratos machos: 4000 mg/Kg

Intervalo de segurança para a cultura de arroz: 35 dias

Nome comercial: Nativo®.

O tebuconazole é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis que tem ação preventiva e curativa e é rapidamente absorvido pelas partes vegetativas da planta. Sua aplicação é foliar e é utilizado no Brasil nas culturas de arroz, café, cevada, soja, *citrus*, trigo, entre outros.

O modo de ação baseia-se na inibição da atividade do lanosterol 14 α -demetilase (CYP51), resultando na ruptura da membrana e subsequente inibição do crescimento celular (GHANNOUM e RICE, 1999; TULLY *et al.*, 2006). Além da inibição de enzimas de fungos, os conazoles também têm potencial para interagir com o sistema citocromo P450 de mamíferos (KJAERSTAD *et al.*, 2010; MENEGOLA *et al.*, 2006).

O tebuconazole possui uma meia-vida longa no solo degradando-se nos produtos mostrados na figura 8 (STRICKLAND *et al.*, 2004).

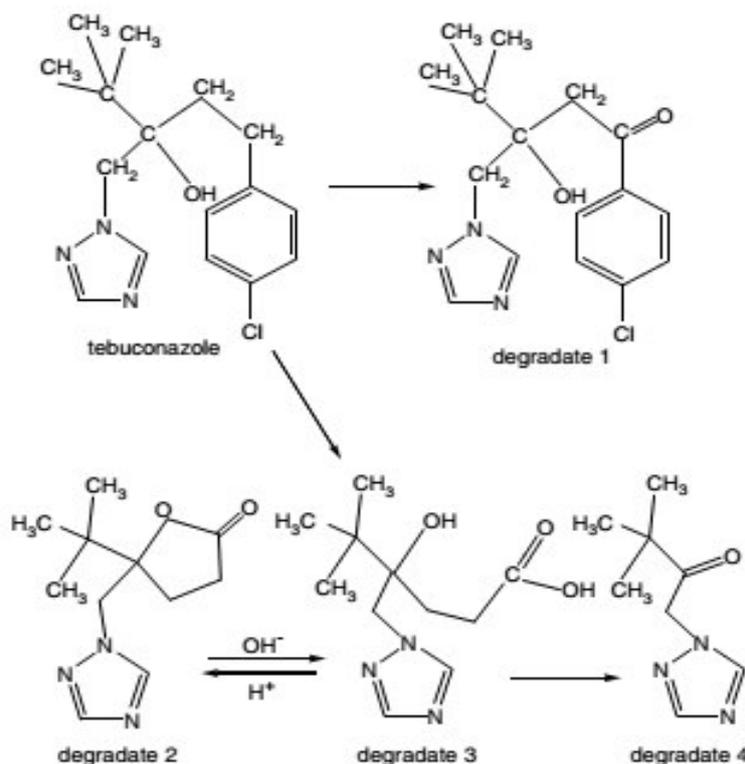


Figura 8. Estrutura do Tebuconazole e seus produtos de degradação. Fonte: Strickland *et al*, 2004.

Vários estudos têm demonstrado que o tebuconazole tem a capacidade de prejudicar o equilíbrio do sistema endócrino de organismos. A desregulação endócrina está relacionada a um mecanismo de toxicidade resultando em inúmeros impactos adversos na saúde de animais, tais como: diminuição da fertilidade, abortos espontâneos, distúrbios neurocomportamentais, função imunológica prejudicada e câncer (MCKINLAY *et al.*, 2008).

2.3 Métodos cromatográficos para determinação de pesticidas

A análise de pesticidas em amostras de água é um problema de interesse preliminar de laboratórios de controle de qualidade, devido ao nível de toxicidade destes compostos e seu risco para a saúde pública (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Uma parcela considerável do total aplicado para fins agrícolas atinge rios, lagos, aquíferos e oceanos por meio do transporte por correntes atmosféricas, eliminação incorreta de restos de formulações, limpeza de acessórios e recipientes empregados na

aplicação desses produtos e também pelo carreamento do material aplicado no solo pela ação erosiva da chuva (CALDAS *et al.*, 2011).

Análises de resíduos de agrotóxicos em água são difíceis de ser executadas, uma vez que esses compostos possuem diferentes propriedades físico-químicas e ocorrem em concentrações extremamente baixas na presença de altas concentrações de compostos interferentes (BRONDI e LANÇAS, 2005).

A determinação de resíduos de agrotóxicos, nas mais diferentes matrizes, é tradicionalmente realizada utilizando-se técnicas cromatográficas, em função de sua capacidade de separação, identificação e quantificação dos compostos através de detectores apropriados (GALLI *et al.*, 2006).

As técnicas analíticas usadas na determinação de pesticidas são, principalmente, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC) acoplada a sistemas de detecção, tais como arranjo de diodos (DAD), detecção por captura de elétrons (ECD), nitrogênio e fósforo (NPD), ou detecção por espectrometria de massa (MS) (NIESSEN, 2010; RENÉ VAN DER HOFF e ZOONEN, 1999; WANG *et al.*, 2011).

ZANELLA *et al* (2000) desenvolveram e validaram um método para determinação do pesticida clomazone em águas de superfície utilizando SPE e HPLC-UV. Obtiveram recuperações de 89,1-104,8% e limite de quantificação de 0,1 µg/L.

PRIMELL (2003) desenvolveu e validou um método para determinação dos pesticidas quincloraque, bentazone, 2,4-D, clomazone e propanil por SPE e HPLC-UV. As recuperações ficaram entre 85,7-109,8%.

RODRIGUES *et al* (2007) desenvolveram e validaram um método para análise de pesticidas em água utilizando SPE e LC-MS.

VICARI (2009) desenvolveu método para análise de bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole por SPE e HPLC-DAD em águas de lavoura de arroz. O método apresentou valores de recuperação entre 76,1 e 116,5%.

ROEHRS *et al* (2009) desenvolveu um método para determinação de bentazone e outros cinco pesticidas em águas de campo por SPE e HPLC-DAD. Foram comparadas as eficiências entre cartuchos C18 e HLB.

NIELL *et al* (2010), validou método que permitiu a determinação dos pesticidas bentazone, propanil, clomazone e mais quatro pesticidas simultaneamente em solos por HPLC-DAD.

RODRIGUES *et al* (2010) desenvolveu e validou método para determinar o fungicida tebuconazol e mais quatro pesticidas também por LC-MS.

CALDAS *et al* (2010) desenvolveu metodologia para determinação de pesticidas de diferentes classes, como carbofuran, clomazone e tebubonazole por LC-MS em amostras aquosas.

2.4 Preparo de amostras empregando SPE para determinação de resíduos de pesticidas em matrizes aquosas

Pesticidas não podem ser analisados, cromatograficamente, em vários tipos de matrizes aquosas sem alguma técnica preliminar de preparação da amostra, a qual é, frequentemente, um dos passos mais críticos no processo analítico. O pré-tratamento inclui o isolamento e a pré-concentração dos analitos (RODRIGUES *et al.*, 2007).

A determinação de concentrações baixas de pesticidas em amostras complexas requer o uso de sistemas de extração e pré-concentração, tais como a extração líquido-líquido (LLE), e a extração em fase sólida (SPE) (BARCELÓ, 1991).

A LLE baseia-se na partição de diferentes analitos entre uma fase aquosa e uma fase orgânica. No entanto, a LLE tem como desvantagens o fato de poder formar emulsões, requerer grandes volumes de solventes, muitas vezes tóxicos e inflamáveis, demandar longo tempo de extração e de difícil automação (BARCELÓ, 1991; FONT *et al.*, 1993).

Hoje em dia a SPE é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A SPE é uma ferramenta poderosa na extração e enriquecimento de traços de pesticidas em soluções muito diluídas, como águas de superfície, para se chegar a concentrações suficientes para detecção do analito (FONT *et al.*, 1993).

A SPE emprega cartuchos recheados com sorventes, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Em geral, os procedimentos de SPE contêm cinco etapas:

- 1- Ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis;
- 2- Condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra;
- 3- Introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes;
- 4- Limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito;
- 5- Eluição e coleta do analito.

A figura 9 mostra as etapas envolvidas no processo de extração por fase sólida (SPE).

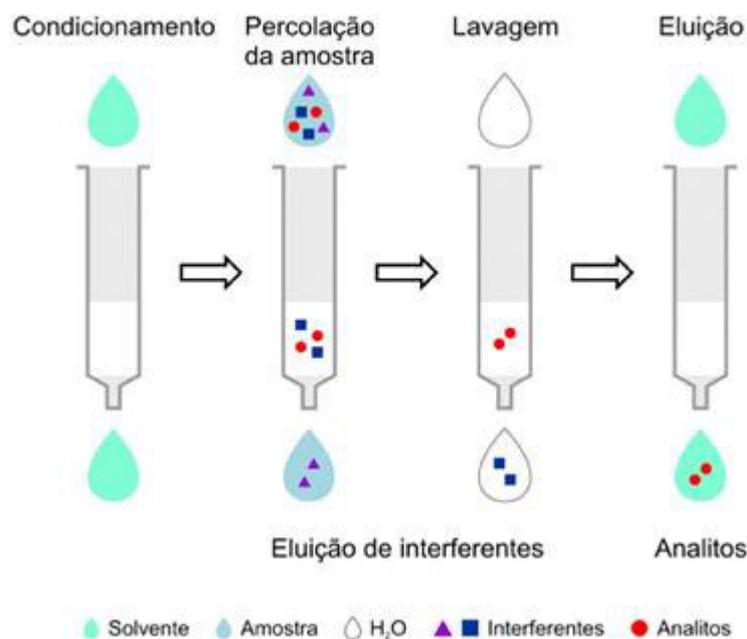


Figura 9. Etapas da extração por SPE. FONTE: CALDAS *et al*, 2011.

Um grande número de sorventes está disponível comercialmente. Polímeros como C8 e C18, e grupos amino ou ciano ligados a um suporte de sílica, carbono grafitizado ou alumina são amplamente utilizados (BARCELÓ, 1991).

Para aumentar a seletividade da extração os sorventes podem ser combinados das seguintes maneiras (QUEIROZ *et al.*, 2001):

- i) Dentro de um mesmo cartucho de extração, usando as chamadas fases mistas com vários grupos funcionais de características diferentes ligados ao mesmo suporte;
- ii) Fazendo sucessivas extrações com cartuchos de diferentes recheios, passando o material eluído do primeiro cartucho para o segundo no modo *on-line* ou *off-line*;
- iii) Recheando o mesmo cartucho com diferentes sorventes, em camadas, resultando em uma coluna de extração tipo sanduíche.

O adsorvente mais popular de SPE para pesticidas em água é o grupo octadecil (C18) ligado à sílica. O principal mecanismo de retenção é a partição, devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H do analito (JUNKER-BUCHHEIT e WITZENBACHER, 1996).

Inúmeros trabalhos vêm sendo feitos utilizando SPE para determinação de pesticidas em águas e fluídos biológicos (CAZORLA-REYES *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2001; MIYAUCHI *et al.*, 2005; PICÓ *et al.*, 2007; ROEHRS *et al.*, 2009).

PRIMEL (2003) aplicou a SPE para a determinação dos herbicidas quincloraque, bentazone, 2,4-D, clomazone e propanil em águas de superfície.

VICARI (2009) desenvolveu método para análise de bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole por HPLC-DAD em águas de lavoura de arroz utilizando SPE.

ROEHRS (2009) utilizou SPE para a determinação por HPLC-DAD do herbicida bentazone e mais cinco pesticidas em água de campo. A eficiência de diferentes cartuchos comerciais foi comparada, tendo sido obtidos melhores resultados para o Oasis HLB®.

Além do Oasis HLB®, que é um cartucho de SPE com sorvente de material polimérico, existem comercialmente outros cartuchos poliméricos como o Strata X® que foi avaliado neste estudo.

2.5 Validação de métodos cromatográficos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis com relação a uma amostra, este deve ser submetido a uma avaliação analítica denominada validação. A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo

cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem induzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método analítico que emprega as técnicas cromatográficas pode ser considerada como o somatório de diferentes etapas a serem incluídas no processo analítico. Geralmente, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros geralmente envolvidos no processo de validação de procedimentos analíticos são: curva analítica, linearidade, seletividade, recuperação (exatidão), precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação e robustez (CHASIN *et al.*, 1998; GARP, 1999).

2.6.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método analítico em distinguir o analito de todo o resto que possa estar presente na amostra, ou seja, corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias suscetíveis de interferirem na determinação analítica, tais como impurezas e produtos de degradação (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento de um método instrumental, pois garante que a resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidas (HARRIS, 2012).

Em HPLC-DAD o tempo de retenção da substância em determinada condição cromatográfica juntamente com o seu espectro de UV são utilizados para a identificação de um determinado composto.

2.6.2 Curva analítica e linearidade

A calibração é um dos estágios mais importantes da análise química (PRIMEL, 2003).

A curva analítica é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento frente a diferentes concentrações das substâncias em estudo (PRIMEL *et al.*, 2005). A curva analítica pode ser construída preparando-se soluções analíticas padrões dos pesticidas em solvente e no extrato da matriz. A curva analítica construída a partir das soluções padrão preparadas em solvente relaciona a resposta do instrumento com a concentração do analito, sem considerar as interferências da matriz em estudo.

Na maioria das técnicas cromatográficas, a relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie deve ser determinada empiricamente, a partir do sinal medido para as diferentes massas ou concentrações conhecidas desta espécie (AUGUSTO *et al.*, 2003). É observada uma relação linear de primeira ordem entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do composto em estudo. A equação da reta que relaciona as duas variáveis pode ser descrita pela regressão linear conforme a equação 1.

$$y = ax + b \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração do analito;

a = inclinação da curva, coeficiente angular;

b = intersecção com o eixo y, coeficiente linear.

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir respostas que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras em uma determinada faixa (HARRIS, 2012). Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação, denominado r. O quadrado do coeficiente de correlação r^2 (coeficiente de determinação) permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo o coeficiente de determinação de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos

experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de correlação estimados. Um r^2 maior que 0,995 ou 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (HARRIS, 2012). A ANVISA (BRASIL, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI, 2004).

2.6.3 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas, ou seja, é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (AMARANTE JR. e ASTROM, 2001; BRITO *et al.*, 2003). Pode ser expressa pela inclinação da curva de calibração, coeficiente angular da equação da reta (a), e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. No caso de uma reta, quanto maior for o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2007).

2.6.4 Limite de detecção e de quantificação

O Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) é a menor quantidade de analito significativamente diferente de um branco (HARRIS, 2012), ou seja, a concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente, quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (RIBANI, 2004). O LOD pode ser expresso pela equação 2:

$$\text{LOD} = (C_s \cdot 2h_n) / h_s \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: C_s = concentração do analito; h_s = altura do pico do analito (h_s deve ser de duas a dez vezes maior que h_n); h_n = maior desvio da linha base medido no tempo de retenção do analito numa faixa de 10 Wh (largura do pico a meia altura).

Na prática, o LOD é determinado pela menor concentração do analito que gera um sinal três vezes maior que o sinal do ruído.

O Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) representa a menor concentração de uma substância que pode ser medida com confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI, 2004). O LOQ também pode ser definido em relação ao ruído, sendo dez vezes maior que o sinal do ruído (HARRIS, 2012), e pode ser expresso pela equação 3:

$$\text{LOQ} = (C_s \cdot 6 h_n) / h_s \text{ (Equação 3)}$$

Neste trabalho, o limite de quantificação foi definido como a menor concentração do menor ponto da curva em que foi possível realizar a quantificação com linearidade, exatidão e precisão aceitáveis.

2.6.5 Exatidão

A exatidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como o valor verdadeiro (INMETRO, 2007).

A exatidão determina a existência de erro sistemático em uma análise, sendo um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um procedimento analítico (CAUSON, 1997; GARP, 1999; PRIMEL, 2003).

A exatidão é sempre considerada dentro de uma faixa de valores, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa.

A exatidão pode ser determinada pela equação 4:

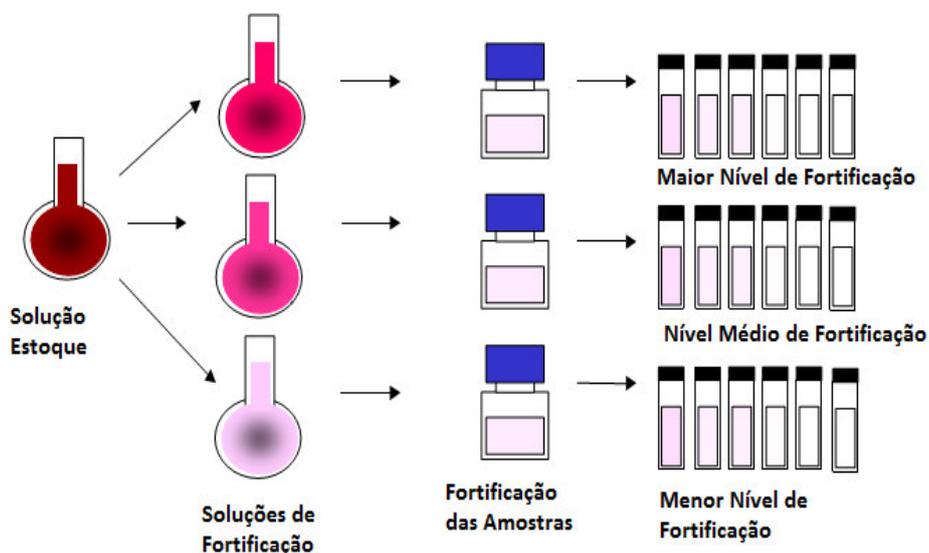
$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{valor real} - \text{valor obtido}}{\text{valor real}} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

2.6.5.1 Recuperação

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos, estando relacionado com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO *et al.*, 2003). É o método mais utilizado para a avaliação da exatidão na validação de métodos cromatográficos (LANÇAS, 2004).

As amostras “branco” são fortificadas em diferentes concentrações, seguidas pela determinação da concentração do analito adicionado. É importante considerar como a eficiência do método varia em função das concentrações da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse, o que é realizado através da adição de uma substância em pelo menos três diferentes concentrações.

A figura 10 exemplifica o processo de fortificação de amostras para a validação de método:



FONTE: BRITO, 2001 (13).

Figura 10. Processo de fortificação de amostras para validação de métodos analíticos.

A recuperação é calculada segundo a Equação 5:

$$R (\%) = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos geralmente são entre 70 e 120%, com precisão de até 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15% (GARP, 1999).

2.6.6 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos em uma mesma amostra, em amostras semelhantes ou em soluções padrões em solvente, nas mesmas condições definidas no método de ensaio. A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade e precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo que a precisão avalia as proximidades entre várias medidas efetuadas para uma mesma amostra (INMETRO, 2007; PEIXOTO, 2007). É normalmente expressa por meio de um desvio padrão (HARRIS, 2012).

2.6.6.1 Repetitividade

É o grau de concordância dos resultados de medições individuais sucessivas quando o procedimento é aplicado repetitivamente a amostragens múltiplas de uma amostra homogênea, ou a amostras artificialmente preparadas (PRIMEL, 2003). É determinada sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições de análise, mesmo local e repetições do ensaio em curto espaço de tempo (VICARI, 2009).

Através da Portaria nº 899 de maio de 2003, a ANVISA sugere que a repetitividade seja verificada através de um mínimo de nove determinações considerando o limite especificado do método (ex: três níveis de fortificação, nas concentrações baixa, média e alta, e três repetições de cada um dos níveis), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (RIBANI, 2004).

A repetitividade é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), reforçando que este teste deve ser realizado pelo mesmo analista, no mesmo laboratório e utilizando o mesmo instrumento.

2.6.6.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à concordância dos resultados de testes obtidos sobre a mesma amostra ou soluções padrão, utilizando o mesmo método, o mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais condições podem variar, como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes dias de análise (FRANCOTTE *et al.*, 1996).

2.6.6.3 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medidas de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de análise. Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (INMETRO, 2007; RIBANI *et al.*, 2004).

2.6.7 Efeito da Matriz

O efeito matriz é resultante da influência de componentes coextraídos da matriz, que podem aumentar ou diminuir o sinal dos analitos, quando comparado ao sinal dos analitos em solvente orgânico (FRENICH, 2009).

O efeito da matriz é dependente das propriedades físico-químicas dos analitos e das características dos componentes endógenos da matriz (tamanho das moléculas, polaridade, etc...) (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998; SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005).

Para a avaliação da existência dos efeitos da matriz pode-se realizar a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas na matriz.

2.7 Fitorremediação

A fitorremediação é uma estratégia que usa plantas para degradar, estabilizar e/ou remover contaminantes do solo ou água (GERHARDT *et al.*, 2009).

Assim, consiste no uso de plantas e seus associados (microbiota) para limpeza de ambientes poluídos. Nessa tecnologia são empregados processos naturais pelos quais as plantas e a flora microbiana, presente na rizosfera¹⁶, degradam e sequestram poluentes orgânicos e inorgânicos. Em geral, para utilizar plantas como fitorremediadores, elas necessitam de crescimento rápido, elevada produção de biomassa, competitividade, vigor e tolerância à poluição (LAMEGO e VIDAL, 2007).

A fitorremediação é potencialmente aplicável a uma variedade de contaminantes, incluindo alguns dos mais significativos como hidrocarbonetos de petróleo, solventes clorados, metais, radionuclídeos, nutrientes, pentaclorofenóis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas (ALI *et al.*, 2013; PIVETZ, 2001).

A fitorremediação utiliza-se dos processos naturais das plantas. Esses processos incluem absorção de água e outras substâncias, metabolismo, ação dos exsudatos no solo e impactos físicos e físico-químicos das raízes no solo (PIVETZ, 2001).

Existem diversos tipos de fitorremediação, como descrito na Tabela 5 (YANG *et al.*, 2005).

¹⁶ Região do solo submetida à influência das raízes dos vegetais e caracterizada por ser uma zona de intensa atividade microbiana.

Tabela 5. Estratégias de Fitorremediação. Fonte: Yang, et al (2005).

Estratégias de Fitorremediação	Mecanismo de Ação	Meio Tratado
Fitoextração	Acumulação direta de contaminantes nas mudas de plantas com subsequente remoção das plantas.	Solo
Rizofiltração (fitofiltração)	Absorção e adsorção dos poluentes nas raízes das plantas.	Águas de superfície e água bombeada através das raízes.
Fitoestabilização	Exsudatos radiculares causam a precipitação de metais e a biomassa torna-se menos biodisponível.	Águas de superfície, solo e rejeitos de minas.
Fitovolatilização	Plantas volatilizam alguns íons metálicos e compostos orgânicos voláteis.	Solo, água de superfície
Fitodegradação	Degradação microbiana na região da rizosfera.	Água e solo
Fitotransformação	Absorção e degradação pela planta de contaminantes orgânicos.	Água
Remoção de contaminantes do ar	Absorção de diversos contaminantes pelas folhas.	Ar

As classificações apresentadas na tabela 5 variam ligeiramente conforme o autor (LAMEGO e VIDAL, 2007; YANG *et al.*, 2005).

A fitoestabilização, além do que foi descrito na tabela 5, consiste no uso de plantas com o propósito de estabilizar os poluentes no solo, prevenindo perdas por erosão ou lixiviação (LAMEGO e VIDAL, 2007).

A fitovolatilização é o processo no qual, após a absorção e incorporação no tecido da planta, os poluentes podem abandoná-la na forma volátil.

A fitoextração ou fitoacumulação consiste na retirada de contaminantes do solo através da acumulação dos mesmos nas plantas. É também conhecida como fitoacumulação, fitoabsorção e fitosequestro (que pode também se aplicar à acumulação de contaminantes no interior das raízes) (PIVETZ, 2001).

Assim, a fitoextração ou fitoacumulação utiliza plantas hiper-acumuladoras que extraem os contaminantes do solo ou da água e acumulam nos seus tecidos. As plantas hiper-acumuladoras são capazes de acumular um ou mais elementos inorgânicos em níveis até cem vezes maiores que outras espécies, crescendo sob as mesmas condições. Para a técnica de fitoextração, fica clara a necessidade da colheita posterior das plantas contendo o poluente acumulado. O processo de fitoextração é muito utilizado para a remoção de metais pesados como As, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Se, e Zn (PILON-SMITS, 2005).

A Fitoextração, em geral, não é considerada para contaminantes orgânicos, uma vez que estes podem ser metabolizados, alterados ou volatilizados pela planta, evitando assim o acúmulo de contaminantes. No entanto, alguns estudos têm mostrado acúmulo de contaminantes orgânicos inalterados dentro da parte aérea de plantas (PIVETZ, 2001).

A figura 11 mostra os principais processos propostos para hiperacumulação em plantas (YANG *et al.*, 2005).

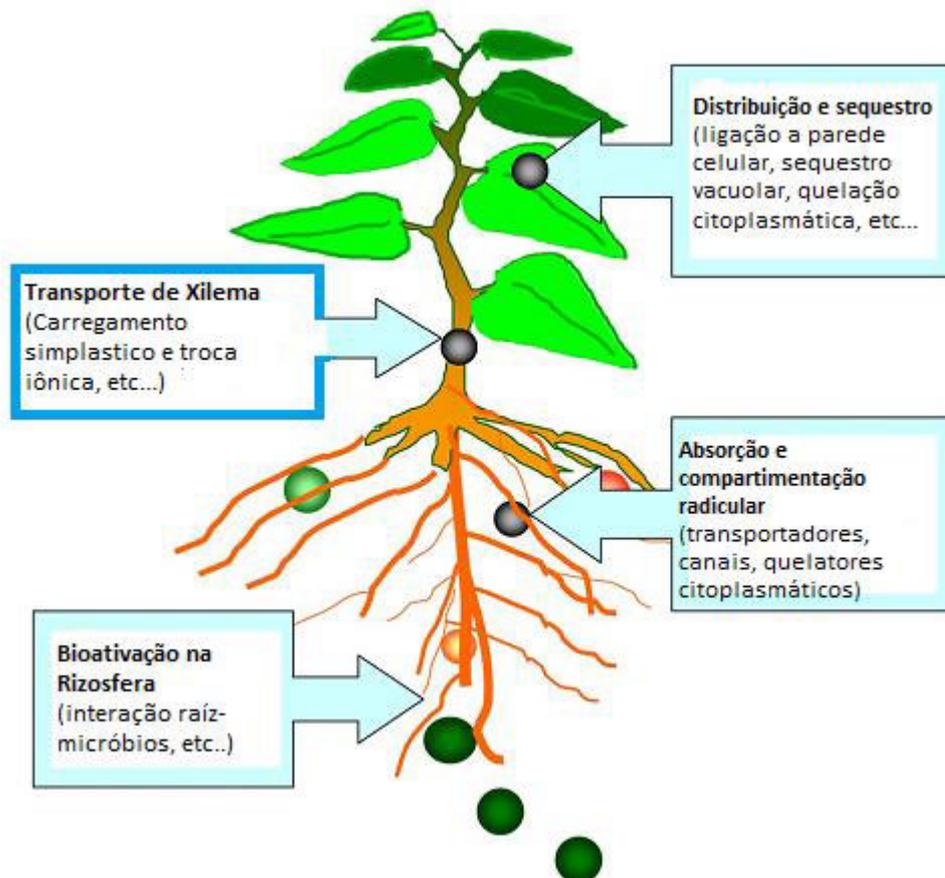


Figura 11. Principais processos propostos para hiperacumulação de metais pesados por plantas. Adaptado de YANG *et al.* (2005).

Outro tipo de fitorremediação é a fitodegradação. Diversos autores não fazem distinção de fitodegradação e fitotransformação, vide tabela 5, usando o termo fitodegradação para ambos os casos. Neste texto, usaremos o termo fitodegradação para a degradação do xenobiótico tanto pela planta quanto pela microbiota associada à rizosfera conforme utilizado por diversos autores (LAMEGO e VIDAL, 2007).

Na fitodegradação, as plantas podem degradar poluentes orgânicos diretamente por suas próprias atividades enzimáticas. Esse tipo de processo é ideal para poluentes orgânicos que são móveis nas plantas (como herbicidas, trinitrotolueno e tricloroetileno), e envolve a ação de complexos enzimáticos nas plantas, como glutatona e citocromo P-450 monooxigenases. A fitodegradação geralmente está associada a plantas, mas pode ser resultado da ação de micro-organismos (LAMEGO e VIDAL, 2007).

A tabela 6 descreve algumas enzimas vegetais e microbianas que possuem papel na degradação de xenobióticos orgânicos (GERHARDT *et al.*, 2009).

Tabela 6. Enzimas vegetais e microbianas com um papel na degradação de compostos orgânicos. Origem microbiana é designado (B) para a bactéria, ou (F) para fungos. Fonte: Gerhardt, *et al* (2009).

Família de Enzimas	Ação Catalítica	Exemplos de Fontes Conhecidas
Dehalogenase	Hidroliza cloro e flúor de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos halogenados.	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> (B). <i>Populus</i> spp. <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> (B)
Laccase	Degradação de vários compostos aromáticos.	<i>Medicago sativa</i> <i>Trametes versicolor</i> (F) <i>Coriolopsis polyzona</i> (F)
Dioxigenase	Degradação de vários compostos aromáticos.	<i>Pseudomonas</i> sp (B). <i>Mycobacterium</i> sp (B).
Peroxidase	Degradação de vários compostos aromáticos; Desalogenação redutiva de hidrocarbonetos alifáticos.	<i>Armoracia rusticana</i> . <i>Phanerochaete chrysosporidium</i> (F). <i>Phanerochaete laevis</i> (F). <i>Medicago sativa</i>
Nitrilase	Cliva grupos cianeto de nitrilas aromáticas e alifáticas.	<i>Salix</i> spp. <i>Aspergillus niger</i> (F).
Nitroredutase	Reduz grupos nitro de compostos nitroaromáticos, remove o nitrogênio de estruturas cíclicas.	<i>Comamonas</i> sp (B). <i>Pseudomonas putida</i> (B). <i>Populus</i> spp.
Fosfatase	Cliva grupos fosfato de organofosforados.	<i>Spirodela polyrhiza</i>
Citocromo P 450 monooxigenase	Hidroxilação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.	Maioria das bactérias aeróbicas, todos os fungos e plantas.

As plantas possuem um arranjo complexo de enzimas que são hábeis para detoxificar xenobióticos, incluindo esterases, citocromo P-450 dependente de oxigenases (enzimas de metabolismo de fase 1), glutathiona S-transferases (GSTs), glucosil transferases (GTs) e malonil transferases (enzimas de metabolismo de fase 2) e transportadores vacuolares dirigidos por ATP (enzimas de fase 3) (KARAVANGELI *et al.*, 2005).

As GSTs, por exemplo, catalisam o ataque nucleofílico do átomo de enxofre da glutathiona a grupos nucleofílicos de uma variedade de substratos hidrofóbicos como herbicidas, inseticidas e carcinógenos, ganhando especial atenção no que diz respeito à detoxificação de herbicidas com o alaclor por exemplo (ARMSTRONG, 1998; DIXON *et al.*, 2002; DIXON *et al.*, 1998; EDWARDS *et al.*, 2000; KARAVANGELI *et al.*, 2005).

A figura 12 ilustra o metabolismo de xenobióticos em plantas.

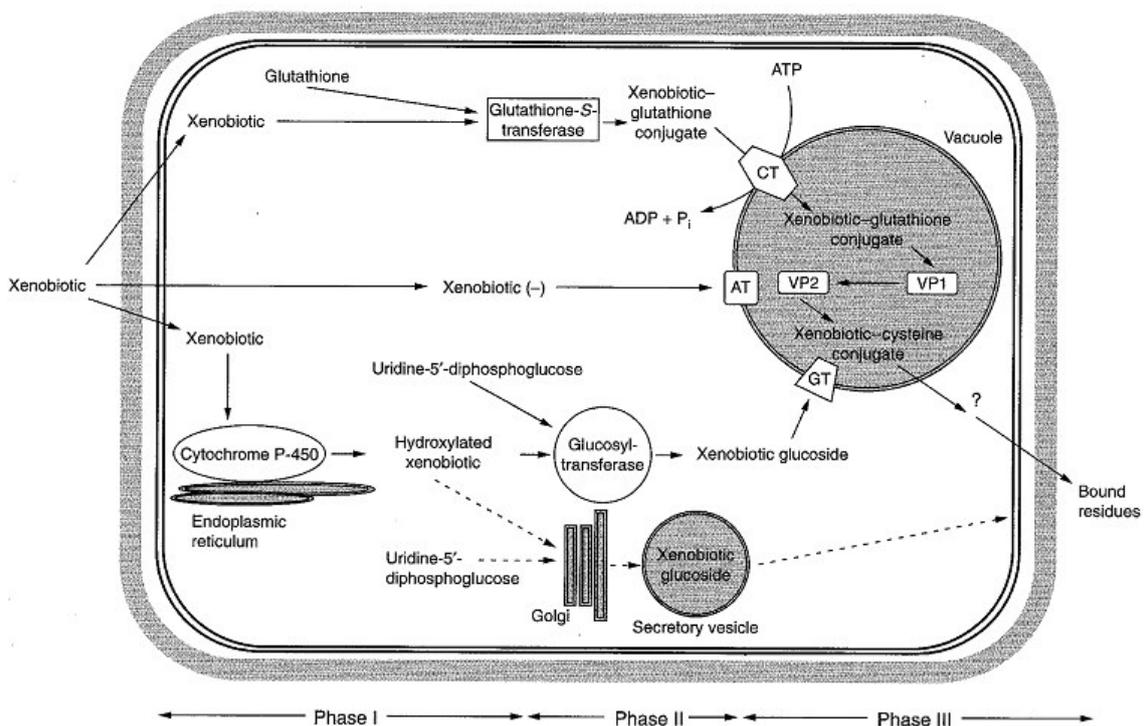


Figura 12. Reações catalisadas por enzimas responsáveis pela desintoxicação de xenobióticos em plantas são localizadas em/ou associadas com vários compartimentos e organelos celulares. As setas tracejadas representam uma via proposta para a glicosilação de xenobióticos no complexo de Golgi, seguido de liberação dos metabólitos no apoplasto por exocitose. Abreviações: CT, transportador glutathiona-conjugado, AT, transportador de xenobióticos aniônicos dependentes de ATP; GT, transportador glicosídeo conjugado dependente de ATP; VP, peptidase vacuolar. **FONTE: COLEMAN *et al* (1997).**

Estudos relatam alguns produtos de degradação para os pesticidas avaliados neste estudo através da biorremediação por plantas e também por micro-organismos.

LAMOUREUX *et al* (1995) descreveu alguns produtos de metabolização do quincloraque em *Euphorbia esula* conforme é mostrado na figura 13.

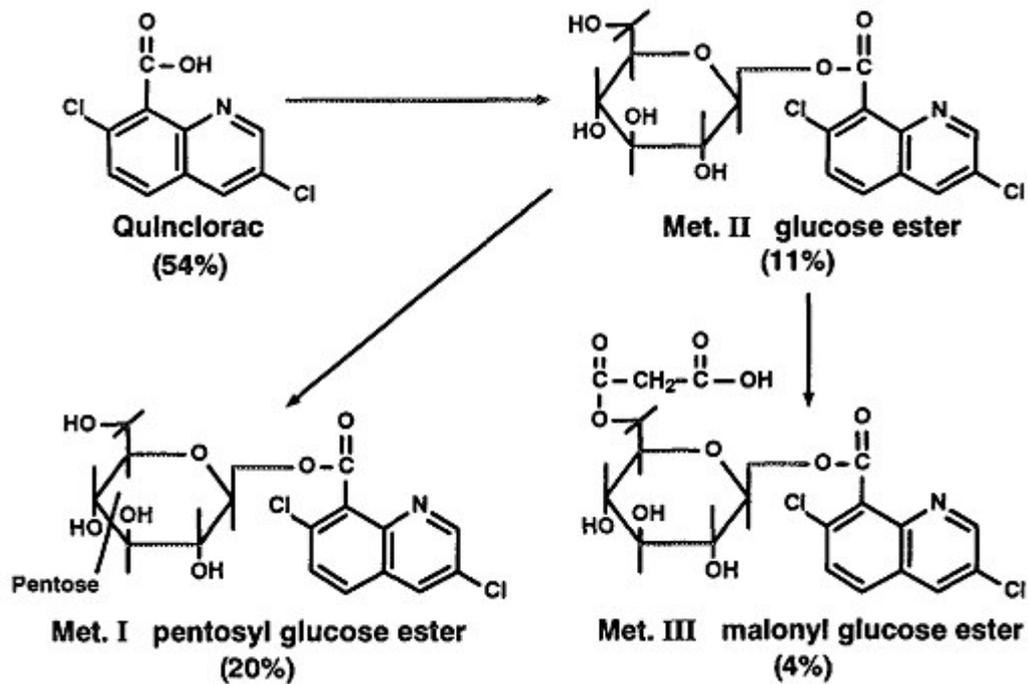


Figura 13. Rota de metabolismo do quincloraque em *leafy spurge*. Adaptado de LAMOUREUX *et al*, 1995.

Ainda para o herbicida quincloraque, por exemplo, estudos de biodegradação realizados mostraram que bactérias como a *Burkholderia cepacia* WZ1 são capazes de degradar o quincloraque como proposto na figura 14 (LI *et al.*, 2009).

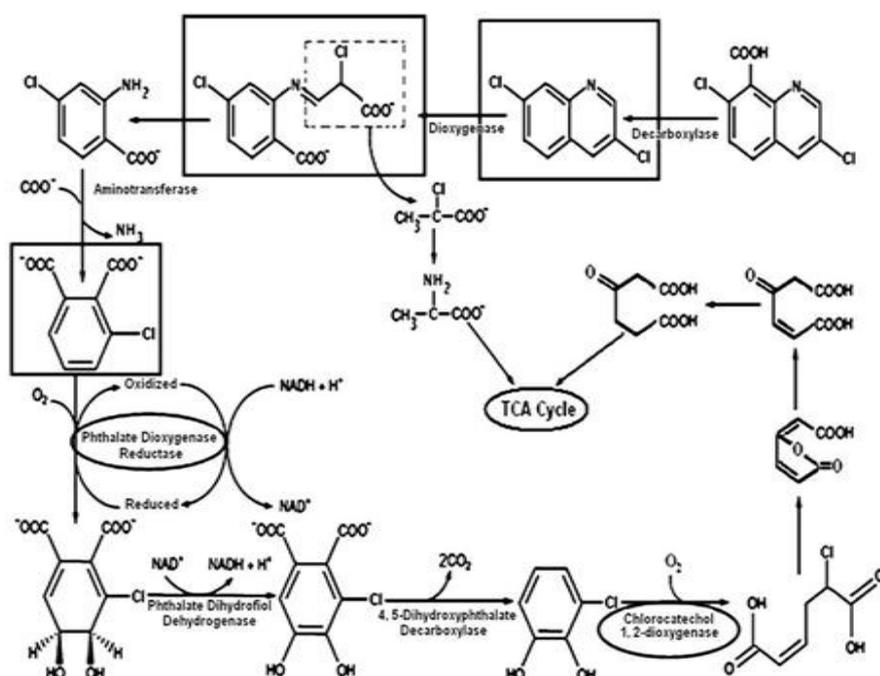


Figura 14. Rota de biodegradação do quincloraque por *B. cepacia* WZ1. Fonte: Li *et al*, 2009.

Herbicidas como o bentazone e 2,4-D, por exemplo, podem sofrer reações de hidroxilação aromática durante o seu metabolismo como mostrado na figura 15.

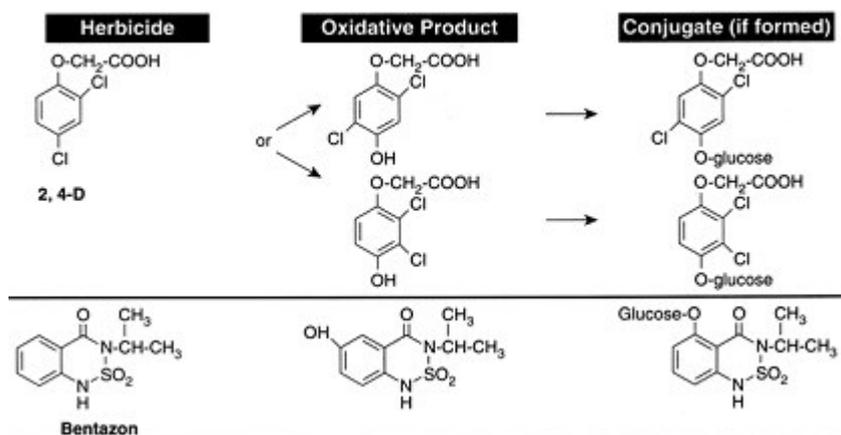


Figura 15. Metabólitos dos herbicidas 2,4-D e bentazone.

O herbicida clomazone pode ser metabolizado por plantas como o arroz que tem a capacidade de detoxificá-lo. A Figura 16 ilustra alguns dos metabólitos para o arroz nesta planta (TENBROOK e TJEERDEMA, 2006).

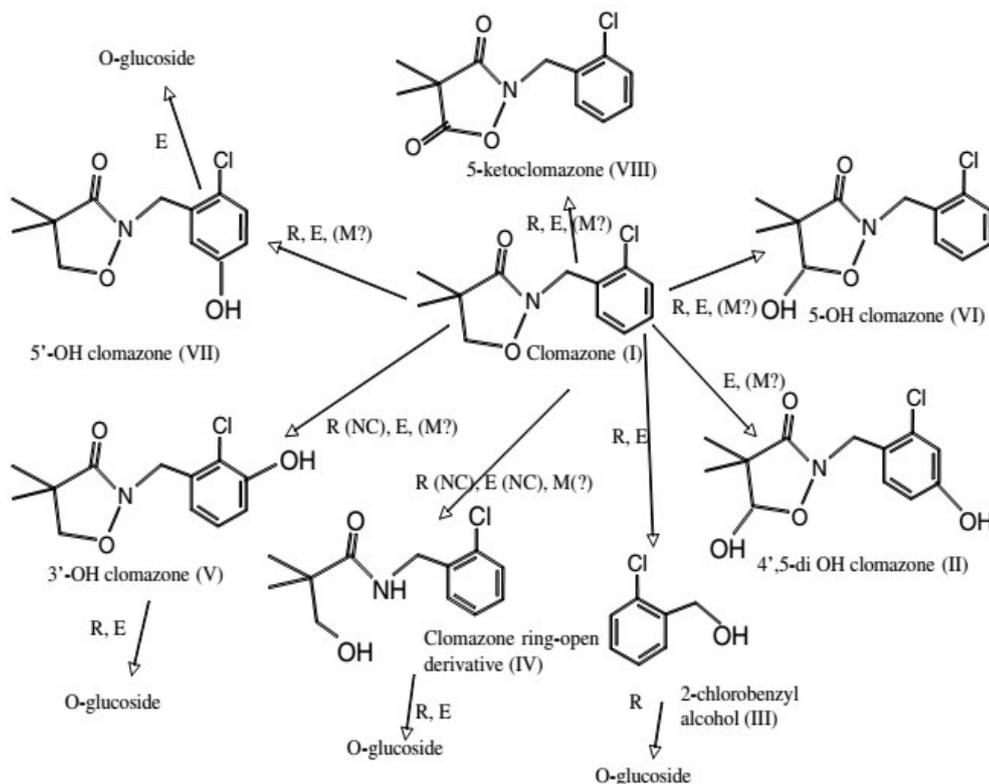


Figura 16. Rota proposta de biotransformação para o clomazone em arroz (R) e milho (EWG), (M?) possível transformação microbiana e NC, não confirmado. Fonte: TenBrook *et al.*, 2006.

Quanto ao pesticida propanil, seu metabolismo é predominantemente por hidrólise (atividade da aril acilamidase), em solos, plantas e animais.

Estudos anteriores utilizaram moléculas de propanil marcadas com ^{14}C e aplicaram em plantas de ervilha (susceptíveis ao herbicida) e arroz (resistente). Raízes e brotos continham quatro metabólitos principais: 3,4-dicloroanilina (Estrutura 2 da figura 17), e três conjugados, um dos quais foi o N-glucosídeo (Estrutura 18). A maior parte dos carbonos marcados foi encontrada em conjugados resultantes da reação do 3,4-DCA com a lignina. Nestes mesmos estudos é reportada a formação de açúcares conjugados do 3,4-DCA com glicose, frutose e xilose (STILL, 1968a; b). Também ocorre a hidroxilação no C2 do grupo propanoil para 3,4-dicloroacetanilida (19) (YIH *et al.*, 1968). A figura 17 mostra o metabolismo do propanil em plantas.

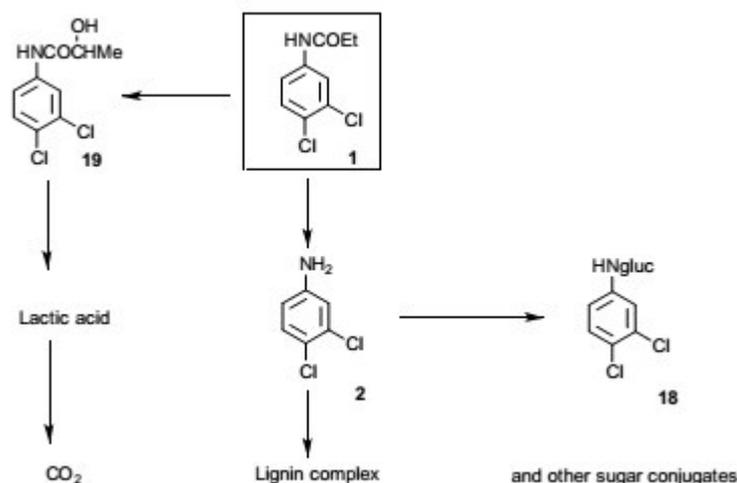


Figura 17. Metabolismo do propanil em plantas.

No entanto, a capacidade da planta detoxificar ou não um determinado xenobiótico, assim como os metabólitos formados, dependerá das enzimas presentes na espécie de planta avaliada (BRAZIER *et al.*, 2002; KARAVANGELI *et al.*, 2005; STIBOROVÁ *et al.*, 2000).

O uso de plantas aquáticas na fitorremediação se justifica pela intensa absorção de nutrientes e pelo seu rápido crescimento, além da facilidade de retirá-las de lagoas e pela possibilidade de aproveitamento de sua biomassa. Assim, neste trabalho foi avaliado o potencial de fitorremediação do cultivo hidropônico de alface.

2.8 Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça da família Asteraceae pertencente a classe Magnoliopsida.

Esta hortaliça possui origem asiática, mas segundo as informações, essa verdura foi utilizada por egípcios, gregos e romanos (UNIJUÍ, 2013).

A história da humanidade lhe faz referência desde os antigos persas. Hipócrates e Dioscorides falam em seu uso na antiga Grécia. Na mitologia grega, a alface é citada quando a deusa Vênus esconde o belo e jovem Adônis, filho de Mirra, num pé de alface. Entre os Romanos, a alface era consagrada a Vênus, e não deveria ser consumida por ser considerado um ato de profanação; Macer Floridus, livro de plantas dos antigos

romanos, falava das virtudes desta planta, como por exemplo, de evitar a embriaguez. Desde este tempo, foi adotado o costume de comer a salada no fim da refeição, e diz Virgílio que esta erva deliciosa finalizava os jantares dos nobres. No século XVI, Brugerinus, no seu livro de Sitologia, inseriu uma monografia da alface, atribuindo-lhe grande efeito sobre a impotência, e recomendava uso diário aos frades como salada (UNIJUÍ, 2013).

No Brasil, entre as hortaliças folhosas, a alface é a mais consumida, representando cerca de 40% do volume negociado pelas empresas de abastecimento (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Este vegetal é uma fonte de fibras, sais minerais e das vitaminas A, B₁, B₂, B₆ e C, além de possuírem propriedades laxantes, diuréticas e lenitivas, bem como um sabor agradável e refrescante (KESKINEN *et al.*, 2009).

O cultivo da alface é realizado pelos sistemas tradicional, orgânico e hidropônico. O método tradicional caracteriza-se pelo cultivo da alface no solo.



Figura 18. Lavoura convencional de alface.

O método hidropônico é caracterizado pelo cultivo de plantas em tubos de plástico contendo uma solução de nutrientes dissolvidos e fertilizantes químicos. Neste sistema, o vegetal permanece protegido contra fatores ambientais adversos, tais como chuva, geada e ventos, o que aumenta a sua produtividade (CHAVES *et al.*, 2000).



Figura 19. Cultivo hidropônico de alface.

Na União Europeia os principais pesticidas utilizados no cultivo de alface, tradicional ou hidropônico, são azoxistrobina, acetamiprida, ciprodinil, fenehexamida, fludioxonil, folpet, iprodiona, metalaxyl, pirimicarbe, and tolifluanida (MELO *et al.*, 2012). A estrutura química do princípio ativo destes pesticidas está representada na figura 20.

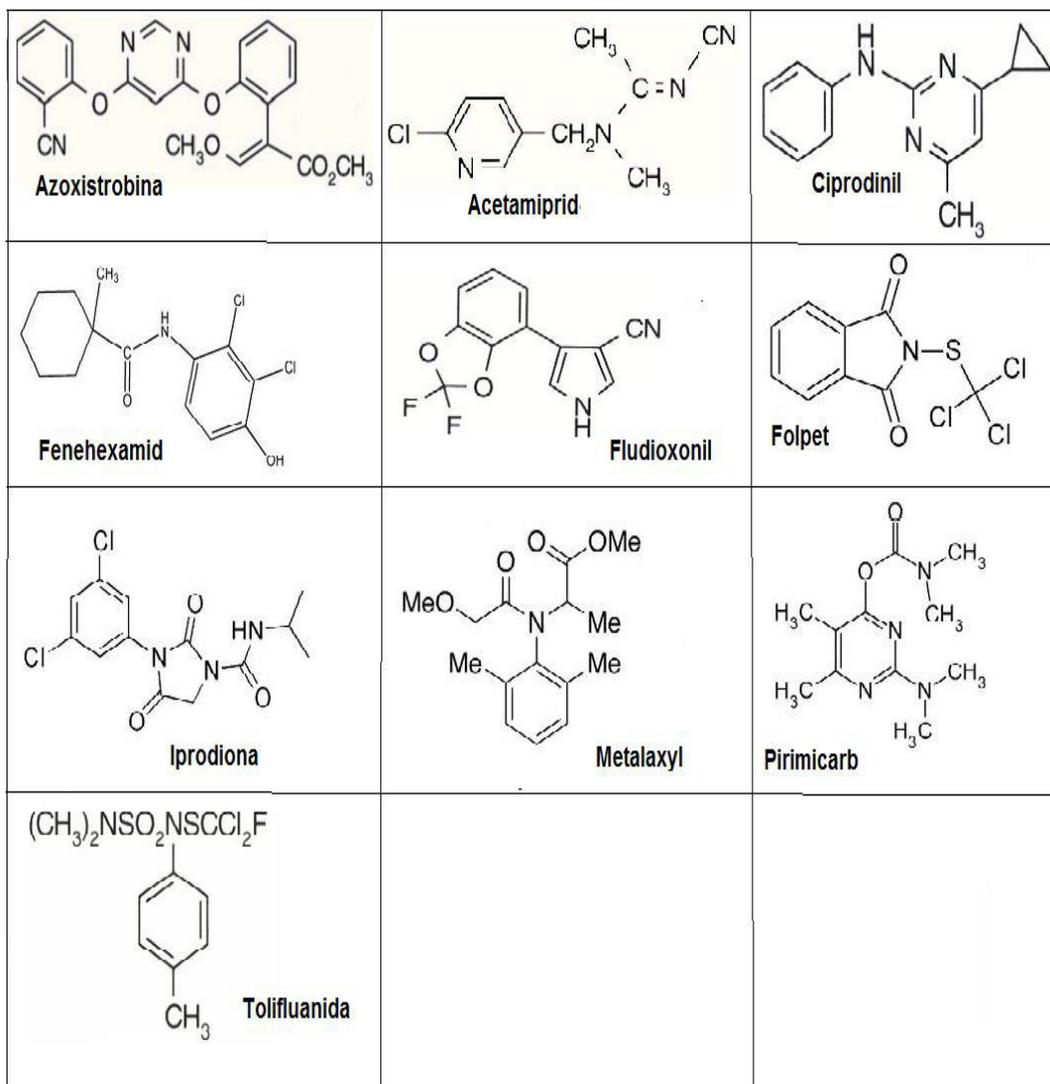


Figura 20. Estrutura química dos pesticidas utilizados no cultivo de alface.

A colheita da planta começa sessenta dias após a sementeira. A plantação deve ser irrigada com abundância e regularmente. É uma hortaliça de inverno, preferindo clima ameno, mas não suportando a geada. A alface pode, no entanto, ser plantada durante o ano todo.

A germinação leva de quatro a seis dias. A alface prefere solos argilo-arenosos, ricos em matéria orgânica e com pH 6,0 a 6,8 (RURAL, 2010; UNIJUÍ, 2013).

Para o verão, são recomendadas as seguintes variedades: babá, Brasil 48, Brasil 58, Brasil 202, Vivi, maravilha de verão, grandes lagos, grand rapids, vitória, Áurea e Luciana. Para o inverno, são indicadas as variedades Aurélia, repolhuda, Boston branca, sem rival, Brasil 311, Brasil 303 e Brasil 221 (RURAL, 2010; UNIJUÍ, 2013).

Para este estudo, foi utilizada alface crespa da variedade Itapuã super.

Estudos anteriores relatam que a alface é capaz de bioacumular Cádmiio (Cd) quando submetida à irrigação com água contendo este metal pesado (AZIZIAN *et al.*, 2011).

No entanto, não existem estudos relatando a influência do uso de água contendo herbicidas no seu cultivo hidropônico, assim como, avaliação do seu potencial como fitorremediadora para os pesticidas avaliados neste estudo e que são amplamente utilizados no cultivo de arroz irrigado na região.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de fitorremediação de águas contendo pesticidas através do cultivo hidropônico de alface (*Lactuca sativa L.*).

3.2 Objetivos específicos

- i) Desenvolver e validar um método multirresidual para a determinação dos pesticidas quincloraque, bentazone, clomazone, propanil e tebuconazole em água potável e de cultivo hidropônico por HPLC-DAD.
- ii) Avaliar a fitorremediação dos pesticidas em cultivo hidropônico de alface (*Lactuca sativa L.*)

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se nos próprios manuscritos.

4.1 Artigo Científico 1

O artigo científico 1 tem como título *Development and Validation of Multiresidual Method for Analysis of Pesticides in Water Cultivation Hydroponic Lettuce using HPLC-DAD*. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito será submetido à Revista *Journal of Brazilian Chemical Society*.

Development and Validation of Multiresidual Method for Analysis of Pesticides in Water Cultivation Hydroponic Lettuce using HPLC-DAD.

Anderson S. Rosa, Bruna P. Ramborger, Maria Luisa C. Zago, Elton L. G. Denardin, Rafael Roehrs.

LEFQPN/PPGBioq/ Universidade Federal do Pampa, *Campus* Uruguaiana, BR 472 Km 592, CP 118, Uruguaiana, RS, Brazil.

Abstract

A sensitive, quick, and simple multiresidue method for the simultaneous determination of six pesticides currently used in rice cultivation — bentazone, clomazone, propanil, quinclorac, tebuconazole and 2,4-D — in water culture hydroponic lettuce is presented. Water samples were extracted with solid-phase extraction cartridges and determination was performed by LC with diode-array detection at 220 nm. The extraction efficiencies of two cartridges, Strata C18 ® and Strata X ®, were compared. The average recovery obtained for these compounds varied from 81 to 117% for Strata C18 ®, with RSDs of 10%, however Strata X ® did not recover any pesticide. The method presented good linearity, and the lower detection limit for the pesticides studied was 1.7 µg/L. The proposed method was also tested in water culture hydroponic lettuce fortified with the six pesticides at 5, 50 and 100 µg/L, with recovery studies showing good results with low RSDs.

1. Introduction

It is well known that pesticides have the potential to prevent and control harmful organisms being a powerful tool against agricultural problems. Pesticides widespread in

agriculture sector are the most economical approach to control the insects and pests, though they are major contaminants of our environment and also are highly toxic to non-target organisms (AZIZIAN *et al.*, 2011). They usually have high mobility in water and soil (ALI *et al.*, 2013; PRIMEL *et al.*, 2007) and can be found in groundwater and surface waters (SILVA e FAY, 2004). Irrigated rice is one of the most important crops in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, occupying 73% of the cropland and in most farms pesticides are applied after irrigation, directly in the water (PRIMEL *et al.*, 2007). Some of the recommended and most used pesticides in rice cultivation are bentazone, clomazone, propanil, quinclorac, tebuconazole and 2,4-D. Liquid Chromatography-diode array detection (LC-DAD) has been used for the determination of pesticide residues in surface and groundwater (CHAKRABORTY e MUKHERJEE, 2013; PALMA *et al.*, 2004; ROEHRS *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2005). Several recent studies have shown the use of aquatic plants and/or plant hydroponic crops such as lettuce, for phytoremediation of heavy metals and organics (HE *et al.*, 2005; HUTCHINSON, 2004). Phytoremediation is among the methods considered as alternatives to conventional water treatment processes (RAHMAN e HASEGAWA, 2011; SCHRÖDER *et al.*, 2007). Water hydroponic cultures, as well as, paddy-field water are complex solutions due to the presence of added mineral salts, in the case of hydroponic cultivation, the difficulty resides in the presence of organic and inorganic compounds occurring naturally or as a result of contamination, or also of biological origin such as fungi and bacteria (ROEHRS *et al.*, 2009). Considering the importance of monitoring the quality of water used and the possible development of phytoremediation using hydroponics techniques, this paper develops an efficient method that allows the determination of five of the most widely used pesticides in the cultivation of rice in solution culture hydroponic lettuce and six in drinking water.

2. Experimental

2.1 Chemicals and Reagents

(a) Ultrapure water — Prepared using a Milli-Q® water purification system (Milford, MA, USA).

(b) Phosphoric acid (H_3PO_4) — Purity 85% (Fluka-Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

(c) Methanol (MeOH) and Acetonitrile (ACN) — LC grade (J. T. Baker, Holland).

(d) Pesticide standards — Bentazone, clomazone, propanil, quinclorac, tebuconazole and 2,4-D were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

(e) Solid-phase extraction (SPE) cartridges — Octadecyl bonded silica sorbent, Strata C18-E[®] (55 μm , 500 mg) and Strata X[®] (55 μm , 500 mg) were obtained from Phenomenex.

(f) 6% Fe EDDHA - Iron chelated by EDDHA with 72% of chelating agent.

(g) Magnesium sulfate – 9% magnesium and 11% sulfur.

(h) Purified MAP - Monoammonium phosphate with 11% nitrogen and 60% P_2O_5 .

(i) Mixed mineral fertilizer – 11% nitrogen, 45% K_2O , 1.2% Sulfur.

(j) Calcium nitrate – 15.5% water soluble nitrogen, 14.5% nitrate, 1% nitrogen ammoniacal and 19% water soluble calcium.

(k) Concentrate micronutrients – 0.916% molybdenum, 4.10% boron, 1.6% Zn EDTA, 4.09% Cu EDTA, 4.09% Mn EDTA and 0.814% nickel.

2.2 Instruments and Apparatus

(a) Liquid chromatograph — Young Lin (YL 9100) system, equipped with quaternary pump, auto sampler, and diode-array detector.

(b) Guard column — Analytical Guard Cartridge System (KJO-4282) (Security Guard phenomenex[®]).

(d) Analytical column — C18 column (Sinergy Fusion RP, 250 mm length and 4.6 mm id) (Phenomenex[®]).

2.3 Preparation of Stock and Working Solutions

Stock solutions of the pesticide standards were prepared by accurately weighing 10.0 mg of each pesticide and dissolving it in 10.0 mL ACN, to obtain a 1000 mg/L stock solution. From this solution, a working standard solution of 100.0 mg/L was

prepared in ACN. This solution was then diluted as needed to prepare different standard solutions: 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/L in ACN.

2.4 Preparation of water hydroponics

In preparing water with nutrients, 0.036 g/L of 6% Fe EDDHA, 0.45 g/L of magnesium sulfate, 0.15 g/L of purified MAP, 0.66 g/L of mixed mineral fertilizer, 0.75 g/L of calcium nitrate and 0.01 g/L concentrate micronutrients were added to water.

2.5 Sample Preparation

Then 100 mL water spiked with six pesticides was filtered through a 0.45 μm filter and acidified to pH 3.0 with phosphoric acid. The filtrate was pre-concentrated in SPE cartridges, Strata C18® and Strata X®, previously conditioned with 3 mL methanol, 3 mL water and 3 mL water pH 3.0. The pH was adjusted with phosphoric acid. Elution was carried out with methanol obtained 1 mL in the end in order to obtain 100-fold pre-concentration. The extract was then filtered through a 0.45 μm pore-size syringe filter and injected in the LC-DAD system.

The same procedure was used for all cartridges evaluated both in water and in water for hydroponics, both fortified with six pesticides.

2.6 Analytical Method

Different compositions of mobile phase, isocratic and gradient, containing acetonitrile, methanol and water (pH 3) were evaluated at ratio of 30:24:46 (ROEHRS *et al.*, 2012), 25:29:46 and 27:27:46; flow rates of 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 and 1.2 ml/min isocratic were evaluated as well. Isocratic gradient and isocratic mobile phases were also evaluated by changing the mobile phase to 30:30:40, 33:27:40 and 27:33:40 with flows 0.9, 1.0, 1.1 and 1.2 ml/min after the first 20 minutes of running.

The LC defined conditions were mobile phase consisting of acetonitrile/methanol/water (pH 3) in the ratio of 27:27:46 with flow rate of 0.9 ml/min at time 0-20 min, and 30:30:40 with flow rate 1.2 ml/min at time 20-35 min. The water pH of the mobile phase was adjusted to pH 3 with aqueous phosphoric acid solution (1:1, v/v). The

injection volume was 20 μ L, and detection wavelengths were 220 nm. The analysis was performed at room temperature. The conditions stated above were optimized for each herbicide alone [retention time (Rt)] and a mix of 5.0 mg/L was used for adjusting the mobile phase isocratic-gradient-isocratic prior to method validation.

3. Results and Discussion

In development of an pesticide multiresidue measurement method by LC-DAD there are crucial requirements to identify analytes correctly by means of their individual UV spectra, retention time, a good resolution between peaks and the elimination of possible interference caused by the matrix effects (ROEHRS *et al.*, 2009).

In order to improve the elution of the compounds, it was necessary to treat samples with acid solutions (pH 3.0) and also use water, pH 3.0, as the one of the mobile phases, particularly in order to keep the acidic groups in their protonated form.

Selection of Chromatographic Conditions

Different compositions of mobile phase isocratic and gradient were evaluated. Initially an isocratic mobile phase containing acetonitrile, methanol and water (pH 3) at ratio of 30:24:46 and flow rate of 0.9 ml/min was evaluated (ROEHRS *et al.*, 2012), however without satisfactory results in the simultaneous separation of all pesticides. In this method, the herbicides clomazone and propanil are too close, thereby making it difficult to quantify them. To obtain better separation between the peaks of the herbicides clomazone and propanil proportions of 25:29:46, and 27:27:46 respectively were also tested and evaluated at different flow rates, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 and 1.2 ml/min, assuring the best results with 27:27:46 and 0.9 ml/min getting narrower and more symmetrical peaks. With the two mobile phase compositions and flow at 0.9 mL/min, it was obtained a good separation for bentazone, clomazone, 2,4-D, propanil and quinclorac, however the fungicide tebuconazole took a very high retention time (38 min) and with a total run time of 40 minutes. To mobile phase 27:27:46, the retention time for tebuconazole took

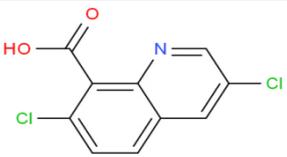
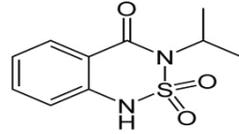
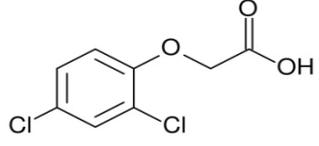
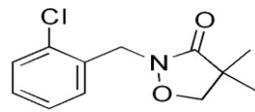
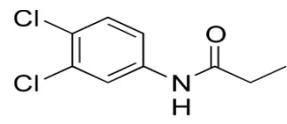
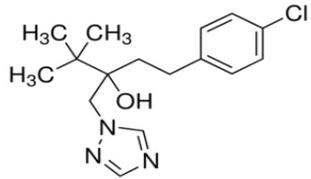
3 minutes less than for the mobile phase 25:29:46. With the flow at 0.8, 1.0, 1.1 and 1.2 ml/min tebuconazole decreased the retention time, although the separations of the herbicides were lost. With 27:27:46 and 0.9 ml/min, mobile phase demonstrated a good resolution of the peaks for the first five compounds, but it took a very long time for elution of tebuconazole which led us to evaluate the use of an isocratic-gradient-isocratic mobile phase in order to decrease analysis time.

To decrease the retention time of tebuconazole, isocratic-gradient-isocratic mobile phases were evaluated by changing the mobile phase after the first 20 minutes to 30:30:40, 33:27:40 and 27:33:40 with flows 0.9, 1.0, 1.1 and 1.2 ml/min. It was necessary to change the mobile phase composition after 20 minutes of run to decrease the tebuconazole retention time, in the 30:30:40 the peak was narrower, more symmetric and showed less noise when changing mobile phase proportion after 20 min than the 33:27:40 and 27:33:40. Different mobile phase flows were tested to improve the peak shape of tebuconazole and decrease the retention time. The best result (thin peak), was showed in the flow of 1.2 mL/min, for other flows evaluated there were peaks tail, wide base and lower area. After these results it was obtained for the second isocratic-gradient with the composition of the mobile phase of 30:30:40 and flow of 1.2 mL/min a better peak for tebuconazole (29.6 min) and an analysis time of 35 minutes.

The LC conditions defined were mobile phase consisted of acetonitrile/methanol/water (pH 3) in the ratio of 27:27:46 with flow rate of 0.9 ml/min at time 0-20 min, and 30:30:40 with flow rate 1.2 ml/min at time 20-35 min.

This combined isocratic-gradient-isocratic solvent system allowed the elution, identification, and quantification of each single pesticide with great accuracy. The order of elution of pesticides was quinclorac, bentazone, 2,4-D, clomazone, propanil and tebuconazol respectively. The analysis time was 35 minutes. A typical chromatogram is shown in Figure 1a. The retention times are listed in Table 1.

Table 1. Retention times for each pesticide studied.

Pesticides	Toxicity class	RT, min	Estructure
Quinclorac	III	8.9	
Bentazone	I	11.3	
2,4-D	I	13.7	
Clomazone	III	16.1	
Propanil	III	18.1	
Tebuconazol	IV	29.6	

During the first isocratic elution, the baseline is clean, without noise. It drifts when the relative amounts of ACN-MeOH-H₂O change in a minute from 27:27:46 and flow 0.9 ml/min to 30:30:40 and flow 1.2 ml/min.

Method Validation

The method validation is the process that is extremely important to ensure the quality of measurements in a process of analysis, reliability, comparability, traceability, as well as interpretability of the results (ALVARADO *et al.*, 2008).

Seeking validation methods evaluated the linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ which are described below for the method.

Linearity - The DAD response for all pesticides was linear in the concentration range assayed (0.5-10 mg/L) with determination coefficients > 0.997 for all pesticides.

Parameters for analytical curves, determination coefficients, LOD and LOQ are listed in Table 2.

LOD and LOQ - The LOD of the method were determined at a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 for the individual pesticides in water by LC-DAD, and were then experimentally verified; whereas, the LOQs were obtained as the lowest spiked level with acceptable recovery and relative standard deviation (DG-SANCO, 2007). The LODs and LOQs obtained are similar to values in water previously reported by others papers (ROEHRS *et al.*, 2009).

Table 2. Parameters for analytical curves and LOD and LOQ for method in hydroponic water medium.

Limiting pesticide	Equation ($y = ax + b$)	r^2	LOD, $\mu\text{g/L}$	LOQ, $\mu\text{g/L}$
Quinclorac	$y = 176.63x - 18.929$	0,9972	1.7	5.0
Bentazone	$y = 104.03x - 12.643$	0,9986	1.7	5.0
2,4-D	$y = 37.608x - 1.3471$	0,9989	1.7	5.0
Clomazone	$y = 51.798x - 1.4227$	0,9994	1.7	5.0
Propanil	$y = 58.066x + 0.6797$	0,9982	1.7	5.0
Tebuconazole	$y = 26,862x - 1.7011$	0,9988	1.7	5.0

Selectivity and matrix effects - Distilled water was used as the tap water blank and hydroponics water without pesticides was analyzed and the absence of pesticides was verified. During the chromatographic analysis matrix components contained in extracts can affect the quantification of the analytes of interest (PINHO *et al.*, 2010). The matrix effect is dependent of the physicochemical properties of pesticides and endogenous

compounds of the matrix (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998; SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005).

To see the influence of matrix samples were evaluated using water and hydroponics. The results show that there was no interference of the matrix except in the case of the pesticide bentazone to the culture medium due to coelution.

Recovery - This study compared two SPE cartridges: the Strata C18 and Strata X. Strata C18 showed good recoveries. Water blanks are fortified at 5.0, 50.0 and 100.0 µg/L. The recoveries obtained for all herbicides ranged from 83 to 110% for Strata C18. All RSDs was < 10.2% (Table 3).

For hydroponics water it was used the same fortification levels. The recoveries for all pesticides ranged from 78 to 102% and RSDs was < 12.7% (Table 4).

Strata X did not recover any of the pesticides evaluated.

These results are in accordance with DG SANCO/2007/3131 of the European quality control guidelines which establishes as acceptable recoveries between 70 and 120% for pesticides (DG-SANCO, 2007).

Repeatability - The repeatability study was carried out by analyzing a solution of the pesticides in a concentration of 0.5 mg/L, injected seven times, to evaluate the RSD of the signal intensities, which were below 11.91% for every pesticide. This RSDs are in agreement with European quality control guidelines which establishes a % RSD of ± 20% (DG-SANCO, 2007).

There is an interferer that eluted at the same retention time of the herbicide bentazone, which does not allow it to be analyzed by the method in hydroponic culture medium. After testing was verified that the interference comes from mixed mineral fertilizer used and may be due to nitrogen compounds or even some impurity.

Table 3. Recovery (rec.) and RSD at 5.0, 50.0 and 100.0 µg/L fortification levels in water. (n=3)

Pesticides	Fortification levels					
	5.0 µg/L		50.0 µg/L		100.0 µg/L	
	Rec., %	RSD, %	Rec., %	RSD, %	Rec., %	RSD, %
Quinclorac	104.994	4.019	85.178	4.333	92.814	6.743
Bentazone	109.736	3.203	89.234	2.254	91.077	6,782
2,4-D	86.296	9.681	87.563	3.516	94.408	7.856
Clomazone	100.136	5.734	83.074	3.064	86.194	9.182
Propanil	96.664	5.653	91.511	2.690	92.163	10.203
Tebuconazole	96.528	5.648	85.124	4.566	85.281	9.521

Table 4. Recovery (rec.) and RSD at 5.0, 50.0 and 100.0 µg/L fortification levels in cultivation water. (n=3)

Pesticides	Fortification levels					
	5.0 µg/L		50.0 µg/L		100.0 µg/L	
	Rec., %	RSD, %	Rec., %	RSD, %	Rec., %	RSD, %
Quinclorac	84.520	5.679	78,666	3.100	77.622	1.721
Bentazone	nq	-	nq	-	nq	-
2,4-D	86.900	1.714	85.552	1.741	91.786	4.264
Clomazone	95.042	12.703	84.211	4.452	84.947	4.452
Propanil	95.813	10.696	89.564	4.358	90.146	3.956
Tebuconazole	102.076	10.039	85.862	4.804	95.671	7.057

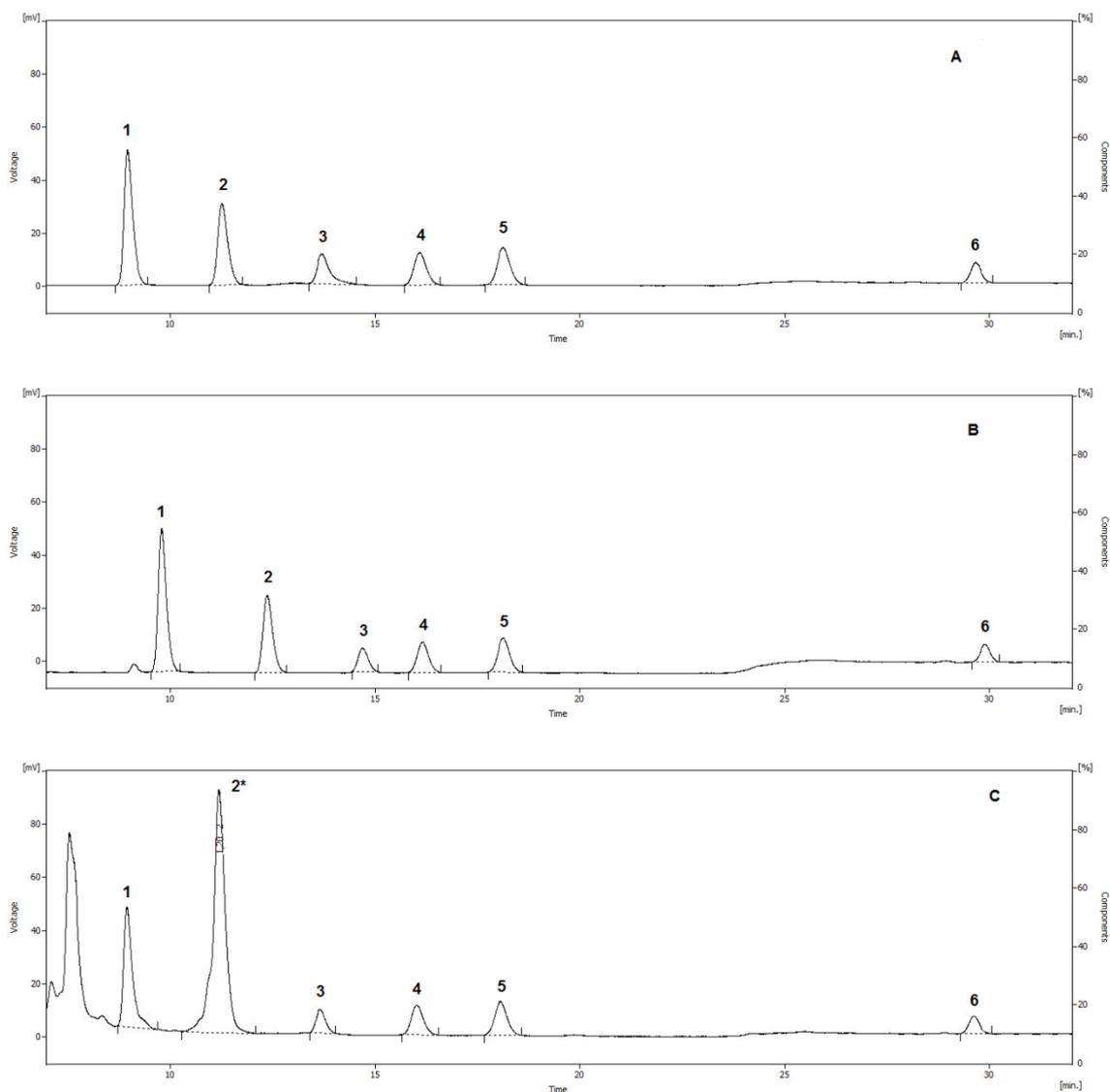


Figure 21. Chromatograms: (a) standard 5 mg/L, (b) extraction Strata C18 in distilled water spiked 50.0 µg/L, (c) extraction hydroponics water spiked 50.0 µg/L. Peaks: (1) Quinclorac, (2) Bentazone, (3) 2,4-D, (4) Clomazone, (5) Propanil, (6) Tebuconazole, (2*) Bentazone and impurities.

4. Conclusions

This method is efficient for the determination of pesticides quinclorac, bentazone, 2,4-D, clomazone, propanil and tebuconazole in water. For hydroponic medium was not possible to determine the pesticide bentazone. The analysis time was relatively small and the peaks of pesticides proved well resolved. The method provides the flexibility to include new agricultural pesticides and/or their degradation products. The LC-DAD method showed good sensitivity and repeatability and is a reliable tool for the determination of herbicides in hydroponics water.

5. Acknowledgments

We acknowledge the FAPERGS and Unipampa.

6. References

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. **Chemosphere**. v.91, p.869-881, 2013.

ALVARADO, S.; GUÉDEZ, M.; LUÉ-MERÚ, M. P.; NELSON, G.; ALVARO, A.; JESÚS, A. C.; GYULA, Z. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). **Bioresource Technology**. v.99, p.8436-8440, 2008.

AZIZIAN, A.; AMIN, S.; MAFTOUN, M.; EMAM, Y.; NOSHADI, M. Response of lettuce to Cd-enriched water and irrigation frequencies **African Journal of Environmental Science and Technology**. Issue 10, v.5, p.884-893, 2011.

CHAKRABORTY, R.; MUKHERJEE, S. Kinetic Studies of Chromium Phytoremediation for Polishing Treated Tannery Effluent by Water Lettuce (*Pistia Stratiotes*). **Asian J. Exp. Biol. Sci.** Issue 2, v.4, p.179-184, 2013.

DG-SANCO, E. C. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. p.3131, 2007.

HAJSLOVÁ, J.; HOLADOVA, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNY, M. Matrix-Induced Effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticides residues. **Journal of Chromatography A**. Issue 2, v.800, p.283-295, 1998.

HE, Z.; JIANGCHUAN, L.; HALYAN, Z.; M., M. Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *lactuca sativa*. **Plant. Sci.** v.168, p.309-318, 2005.

HUTCHINSON, S. L. **A Study on the Accumulation of Perchlorate in Young Head Lettuce** U.S. Environmental Protection Agency. Manhattan: September 2004 2004.

PALMA, G.; SÁNCHEZ, A.; OLAVE, Y.; ENCINA, F.; PALMA, R.; BARRA, R. Pesticide levels in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**. v.57, p.763-770, 2004.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos Constituintes Químicos dos Extratos de Diferentes Matrizes na Resposta Cromatográfica de Agrotóxicos. **Química Nova**. Issue 4, v.33, p.909-913, 2010.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MARTINS, M. L.; MACHADO, L. O. S.; MARCHESAN, E. Risk Assessment of Surface Water Contamination by Herbicide Residues: Monitoring of Propanil Degradation in Irrigated Rice Field Waters Using HPLC-UV and Confirmation by GC-MS. **J. Braz. Chem. Soc.** v.18, p.585, 2007.

RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H. Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes. **Chemosphere** **83**. p.633-646, 2011.

ROEHRS, R.; PIZZUTTI, I. R.; ADAIME, M. B.; PAREJA, L.; NIELL, S.; CESIO, M. V.; HEINZEN, H. Liquid Chromatographic-Diode-Array Detection Multiresidue Determination of Rice Herbicides in Drinking and Paddy-Field Water. **Journal of AOAC International**. Issue 4, v.92, p.1190-1195, 2009.

ROEHRS, R.; ROEHRS, M.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R. Biodegradation of Herbicide Propanil and Its Subproduct 3,4-Dichloroaniline in Water. **Clean – Soil, Air, Water**. Issue 9, v.40, p.958-964, 2012.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; MARTÍN, G.; TADEO, J. L. Determination of Pesticide Residues by GC-MS Using Analyte Protectants to Counteract the Matrix Effect. **Anal. Sci.** Issue 11, v.21, p.129, 2005.

SÁNCHEZ-ORTEGA, A.; SAMPEDRO, M. C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main

metabolites in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**. v.1094, p.70-76, 2005.

SCHRÖDER, P.; NAVARRO-AVINÓ, J.; AZAIZEH, H.; GOLDHIRSH, A. G.; DIGREGORIO, S.; KOMIVES, T.; LANGERGRABER, G.; LENZ, A.; MAESTRI, E.; MEMON, A. R.; RANALLI, A.; SEBASTIANI, L.; SMRCEK, S.; VUILLEUMIER, S.; WISSING, F. Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, p.490-497, 2007.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Pesticidas & Ambiente. **Embrapa Informações Tecnológicas**. p.145-192, 2004.

4.2 Artigo Científico 2

O artigo científico 2 tem como título *Phytoremediation of pesticides in water using hydroponic cultivation of lettuce (Lactuca sativa L.)*. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito será submetido à Revista *Chemosphere*.

**Phytoremediation of pesticides in water using hydroponic cultivation of lettuce
(*Lactuca sativa L.*)**

**Anderson S. Rosa, Maria Luisa C. Zago, Bruna P. Ramborger, Elton L. G.
Denardin, Rafael Roehrs.**

LEFQPN/PPGBioq/ Universidade Federal do Pampa, *Campus* Uruguaiana, BR 472
Km 592, CP 118, Uruguaiana, RS, Brazil.

Abstract

This study evaluated the phytoremediation of pesticides through the hydroponic cultivation of lettuce. The removal rate of five compounds (quinclorac, 2,4-D, clomazone, propanil and tebuconazol) from water by lettuce was assessed in laboratory tests. The plants were exposed to a mixture of this five pesticides in a concentration of 50 µg/L each. It is possible to observe that the ideal treatment time for tebuconazol fungicide and herbicide quinclorac was 7 days which was the maximum phytoaccumulation on the plant. The lettuce also showed degrade the metabolite of propanil, 3,4-DCA after 14 days. For both 2,4-D and clomazone herbicides a 14 days treatment showed excellent results additionally indicating possible degradation by the metabolism of plant studied. This study showed that the hydroponic cultivation of lettuce can be an efficient, low cost and effective method for phytoremediation of the pesticides studied.

1 Introduction

Pesticides are widely used in modern agriculture for pest control significantly increasing productivity. Extensive agricultural use of pesticides can lead to significant risk to non-target organisms within adjacent aquatic and terrestrial ecosystems (DOSNON-OLETTE, 2009).

The main commercial products are synthetic organic compounds with high biological activity, among them stand insecticides, fungicides and herbicides that are generally toxic and may be carcinogenic and mutagenic (SILVA e FAY, 2004). Pesticide residues and their transformation products are frequently found in groundwater and surface waters (ÖNNEBY *et al.*, 2009). Irrigated rice is one of the most important crops in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, occupying 73% of the cropland and in most farms pesticides are applied after irrigation, directly in the water (PRIMEL *et al.*, 2007).

Several biological strategies can be applied to remove toxic substances, including herbicides, from the environment and are collectively known as bioremediation. Bioremediation is the exploitation of biological activities for mitigation, and when possible, complete elimination of the toxic effects caused by environmental pollutants. (ROEHRS *et al.*, 2012).

One type of bioremediation that has stood out over the last 10 years is the phytoremediation, consisting in the use of plants and their associated microorganisms for cleaning polluted environments. This method has gained popularity as a cost effective, environmentally friendly and efficient *in situ* technology for a variety of pollutants (ALI *et al.*, 2013; EAPEN *et al.*, 2007; PILON-SMITS, 2005).

Some Plants have constitutive and adaptive mechanisms for accumulating or tolerating high contaminant concentrations in their rhizospheres (YANG *et al.*, 2005). Plants contain a complex array of enzymes which are able to detoxify xenobiotics including esterases and cytochrome P450-dependent oxygenases (phase 1 metabolizing enzymes), glutathione S-transferases (GSTs), glucosyl transferases (GTs) and malonyl transferases (phase 2 metabolizing enzymes) and ATP-driven vacuolar transporters (phase 3 enzymes) (KARAVANGELI *et al.*, 2005).

Recent studies show the application of this method to cleanup environments containing pesticides (DOSNON-OLETTE, 2009; SCHRÖDER e COLLINS, 2002).

Lettuce (*Lactuca sativa L.*) shows the ability to absorb Cd like as demonstrated by some investigations (AZIZIAN *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2005), as well as, perchlorate (HUTCHINSON, 2004).

This study aims to evaluate the phytoremediation of water containing five pesticides (quinclorac, 2,4-D, clomazone, propanil and tebuconazol) recommended for irrigated rice by using hydroponic lettuce.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

(a) Deionized water — Prepared using a Milli-Q[®] water purification system (Milford, MA, USA).

(b) Phosphoric acid (H_3PO_4) — Purity 85% (Fluka-Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

(c) Methanol (MeOH) and Acetonitrile (ACN) — LC grade (J. T. Baker, Holland).

(d) Pesticide standards — Clomazone, propanil, quinclorac, tebuconazole and 2,4-D were purchased from (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

(e) 6% Fe EDDHA - Iron chelated by EDDHA with 72% of chelating agent.

(f) Magnesium sulfate – 9% magnesium and 11% sulfur.

(g) Purified MAP - Monoammonium phosphate with 11% nitrogen and 60% P_2O_5 .

(h) Mixed mineral fertilizer – 11% nitrogen, 45% K_2O , 1.2% Sulfur.

(i) Calcium nitrate – 15.5% water soluble nitrogen, 14.5% nitrate, 1% nitrogen ammoniacal and 19% water soluble calcium.

(j) Concentrate micronutrients – 0.916% molybdenum, 4.10% boron, 1.6% Zn EDTA, 4.09% Cu EDTA, 4.09% Mn EDTA and 0.814% nickel.

2.2 Instruments and Apparatus

(a) Liquid chromatograph — Young Lin (YL 9100) system, equipped with quaternary pump, auto sampler, and diode-array detector.

(b) Guard column — Analytical Guard Cartridge System (KJO-4282) (SecurityGuard phenomenex®).

(d) Analytical column — C18 column (Sinergy Fusion RP, 250 mm length and 4.6 mm id) (Phenomenex®).

(e) Solid-phase extraction (SPE) cartridges — Octadecyl bonded silica sorbent, Strata C18-E ® (55 µm, 500 mg) was obtained from Phenomenex.

2.3 Preparation of water hydroponics

For water preparation with nutrients it was added to water 0.036 g/L of 6% Fe EDDHA, 0.45 g/L of magnesium sulfate, 0.15 g/L of purified MAP, 0.66 g/L of mixed mineral fertilizer, 0.75 g/L of calcium nitrate and 0.01 g/L concentrate micronutrients. Each of the six nutrients added respectively is composed:

Subsequently, the culture medium was supplemented with 5 pesticides patterns for the concentration of 50 µg / L.

2.4 Sample Preparation and Chromatographic conditions

Cultivation medium samples were collected and extracted using solid phase extraction (SPE) and analyzed by high efficiency liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) as described by Rosa *et al* (20XX).

Then 100 mL water was filtered through a 0,45 µm filter and acidified to pH 3.0 with phosphoric acid (1:1, v/v). The filtrate was pre-concentrated in cartridge previously conditioned with 3 mL methanol, 3 mL water and 3 mL water pH 3.0. The pH was adjusted with phosphoric acid (1:1, v/v). Elution was carried out with methanol obtained 1 mL in the end in order to obtain 100-fold pre-concentration. The extract was then filtered through a 0.45 µm pore-size syringe filter and injected in the LC-DAD system.

The LC conditions was mobile phase consisted of acetonitrile/methanol/water pH 3 (phosphoric acid, 1:1 v/v) in the ratio of 27:27:46 with flow rate of 0,9 ml/ min at time 0-20 min, and 30:30:40 with flow rate 1,2 ml/min at time 20-35 min. The water pH of

the mobile phase was adjusted to pH 3 with aqueous phosphoric acid solution (1:1, v/v). The injection volume was 20 μ L, and detection wavelengths were 220 nm.

2.5 Cultivation System

The lettuces were grown in pots containing 1 L from solution of cultivation and fixed in Styrofoam leaving only the roots submerged. Five plants were placed in each pot. Controls were prepared in the same manner, but without lettuce. The experiment was performed in triplicate. As a source of light and heat were used fluorescent lamps white, red, yellow and blue, and also incandescent lamps, simultaneously. The seedlings were grown for 10 days to adapt to the culture medium and on the tenth day the medium was fortified with 5 pesticides. Water samples were collected after 7 and 14 days after fortification.

2.6 Statistical analysis

In this study data are presented as means \pm S.D. Significant differences between controls and spiked samples were determined by the One Way ANOVA test followed by the Tukey's test, P values < 0.05 were considered significant.

3 Results and Discussion

Phytoremediation is a strategy that uses plants to degrade, stabilize and / or remove contaminants from soil or water (GERHARDT *et al.*, 2009). It can be split in phytoextraction or fitoacumulation, phytostabilization, fitovolatilization and phytodegradation, among others (LAMEGO e VIDAL, 2007; YANG *et al.*, 2005).

This study evaluated the ability of phytoremediation for five herbicides and a fungicide.

Pesticides are synthesized molecules to affect certain biochemical reactions of insects, microorganisms, plants and animals that must be controlled or eliminated. Thus, they have an important role to increase agricultural productivity (SOSBAI, 2010).

The lettuce has a cultivation period that changes according to the season in which it is cultivated and can also vary according to the variety and form of cultivation. In summer, the harvest period occurs in 60 to 70 days after the start of cultivation and, in winter, extending around 80 to 90 days (RURAL, 2010).

Many varieties are grown as elisa, regina, brazil 303, daniele, four seasons, of smooth leaves. And also, grand rapids, veronica, marianne, hydrangea, crinkly, blonde vanessa and itapuã super, all curly leaves (RESENDE *et al.*, 2007). Previous studies report that the lettuce is able to bio accumulate Cadmium (Cd) when subjected to this water containing heavy metal (AZIZIAN *et al.*, 2011).

In this study, plants showed good development during the first 10 days of culture to adapt to hydroponic medium. During the experiment it was noted that this adaptation period is very important because plants do not grow well without it.

After the addition of pesticides during the first week the treatment decreased significantly lettuce growth rate. From the 7th to the 14th day of treatment, there was the death of some plants. On the 14th day it was found a large number of dead plants or multiple sheets in the process of necrosis.

The figure 1 shows the percentage of pesticides found in the initial day of treatment, after 7 and 14 days for the control and the samples with plant.

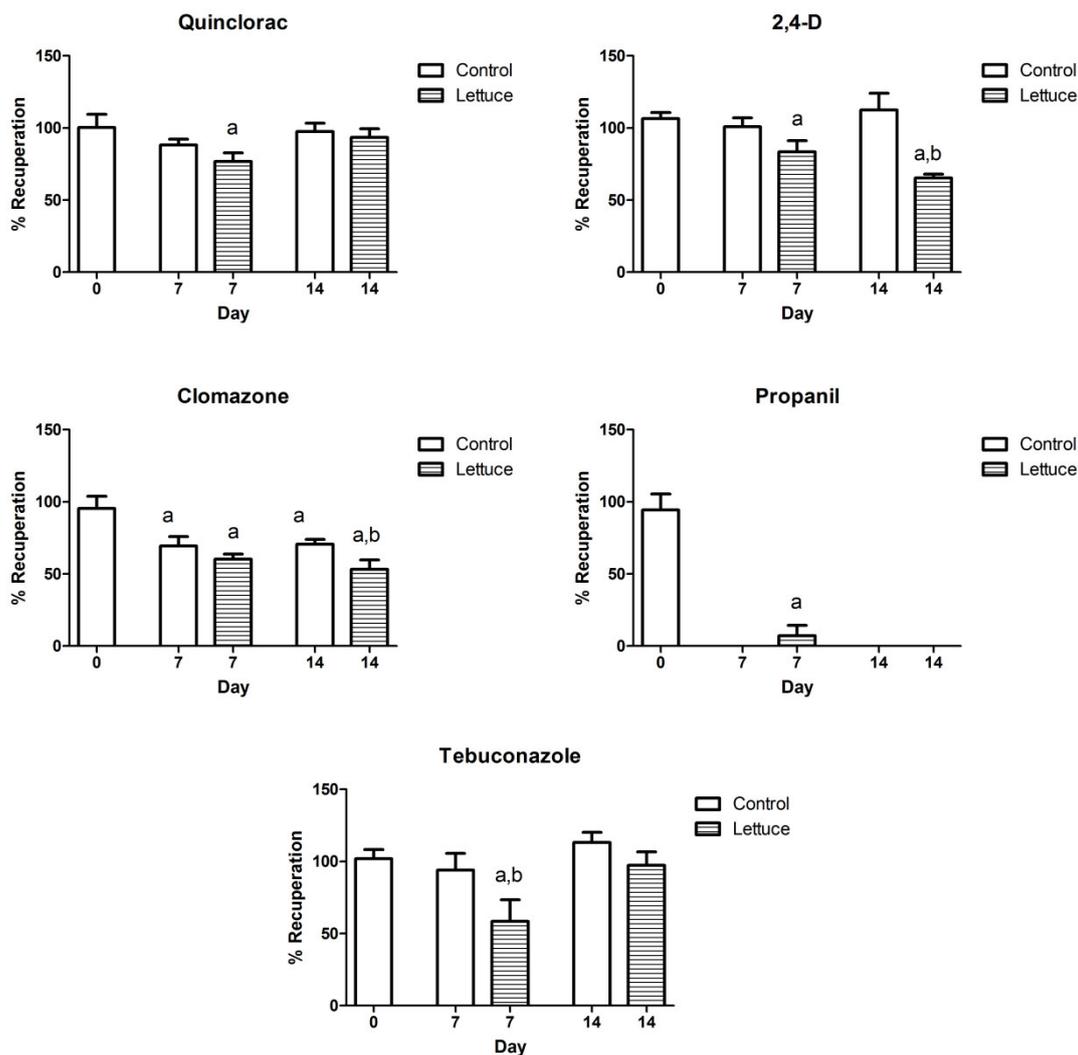


Figure 1. Recovery (%) are presented as means \pm S.D. of pesticides during treatment (n=3). P values < 0.05 were considered significant. (a) significantly different from controls at day 0. (b) significantly different than control on the same day.

Quinclorac is considered a highly selective herbicide used in rice cultivation against mono and dicotyledonous weeds, especially the so-called barnyard grass (GROSSMANN, 1998). Recent study has reported that the commercial formulation containing metsulfuron-methyl and quinclorac in concentrations equal to those recommended for the cultivation of rice, inhibit acetylcholinesterase and biochemical changes induced in tissues of chirped (*Leporinus obtusidens*) as a reduction of antioxidant catalase, however, not causing lipid peroxidation (PRETTO *et al.*, 2011). In our experiment, seven days after application, quinclorac showed significant degradation in the sample with plant relative to initial control, although it was not significant when

compared to control samples on the same day. However, in the fourteenth day there was an increase in the amount of herbicide recovered.

2,4-D has low biodegradability and it is often found in rivers and streams. Other studies of the environmental effects of this herbicide show that it is toxic to aquatic invertebrates, phytoplankton and fish (CHENEY *et al.*, 1997; QUE-HEE, 1981; ROBLES-GONZÁLEZ *et al.*, 2006; SANDERS, 1969; VILLALOBOS *et al.*, 1996). For this herbicide there was a significant decrease in the amount of pesticides found after 14 days in relation to both initial control and the control on the same day of collection. The results show a decline of 41% compared to the control on the fourteenth day.

The clomazone acts as an inhibitor of the synthesis of photosynthetic pigments and other important substances in higher plants (FERHATOGLU e BARRETT, 2006). In the experiment it was observed the emergence of a few whitish leaves. Clomazone showed good results, a degradation of 17% was obtained compared to control in the same day and 42% compared to day zero.

In the last sample collected propanil was not detected on the control samples as well with the lettuce. In the environment propanil has a half-life of 1 to 3 days being rapidly degraded 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) which is a highly toxic molecule (ROEHRS *et al.*, 2012). Propanil was completely degraded during the experiment, however, the same was true for the control. Propanil is cleaved enzymatically in plants, mammalian liver and soil into 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) and also during alkaline hydrolysis (ROEHRS *et al.*, 2012).

In a yet unpublished work of the group it was determined an elution order for some pesticides and metabolite 3,4-DCA which has: quinclorac, bentazone, 2,4-D and 3,4-DCA using a mobile phase acetonitrile, methanol and water pH 3 with phosphoric acid (1:1, V/V) in the ratio of 30:24:46 and flow of 0,8 mL/min. In the present study, it was observed the same elution order for the herbicide quinclorac, bentazone and 2,4-D. In Figures 2 and 3 show chromatograms of samples without and with lettuce, respectively, collected on the 14th day of the experiment. The lettuce sample has not presented peak between bentazone and 2,4-D herbicides precisely in the interval between peaks that one would expect a peak of 3,4-DCA. But a peak is observed in the sample without lettuce.

This result for the 3,4-DCA is a very promising result. For both, in control and in lettuce, propanil has completely deteriorated, but the degradation performed by lettuce not lead to the formation of this metabolite that is more toxic than propanil.

Tebuconazole is a fungicide recommended for the cultivation of rice, coffee, barley, citrus, wheat, among others. Previous researches report that tebuconazole has a long half-life in the soil (Strickland, Potter *et al.* 2004).

For the tebuconazole fungicide it was obtained a significant degradation after 7 days relative control of the same day and from day 0. On this day it was obtained a 35.5% greater degradation of the fungicide compared to control on the same day and 43% decrease in the concentration of it compared to day 0. However, in the 14th day the concentration of tebuconazole in water increased again. Thus, the amount of the fungicide obtained after two weeks was not significantly different than controls at day 0 and 14.

Based on the results presented pesticides quinclorac and tebuconazole showed the best results in 7 days of the experiment. This can be explained by the negative growth rate due to necrosis of leaves, and in some cases, death of the entire plant was observed during the second week of the experiment. Thus, we believe it occurs phytoaccumulation of these two xenobiotics in the plant in the first week, however, there is a high return of these substances into the water due to the negative growth rate of the species during the test and the absence of the formation of new green biomass. Results like this have been shown in previous phytoremediation studies with some plants for other water contaminants xenobiotics (ALVARADO *et al.*, 2008).

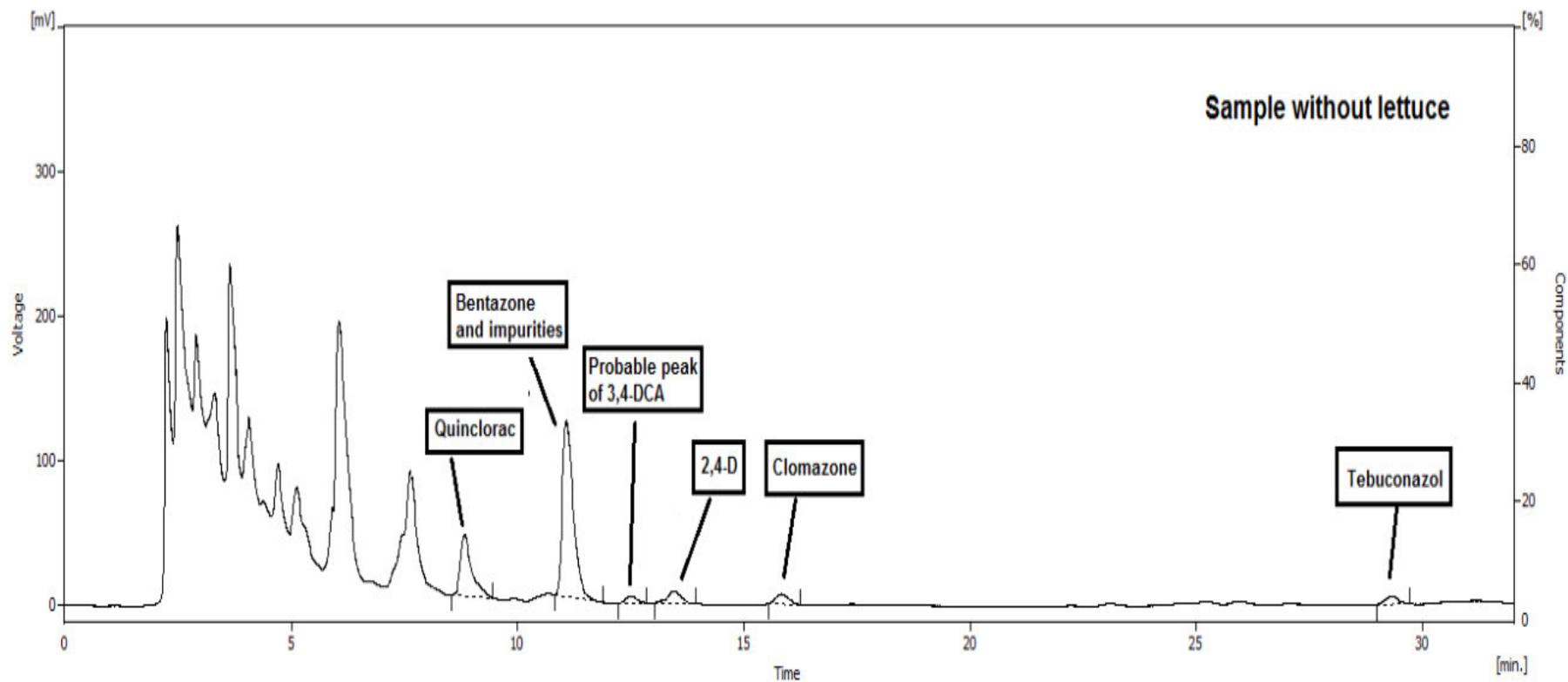


Figure 2. Sample without lettuce collected on the fourteenth day.

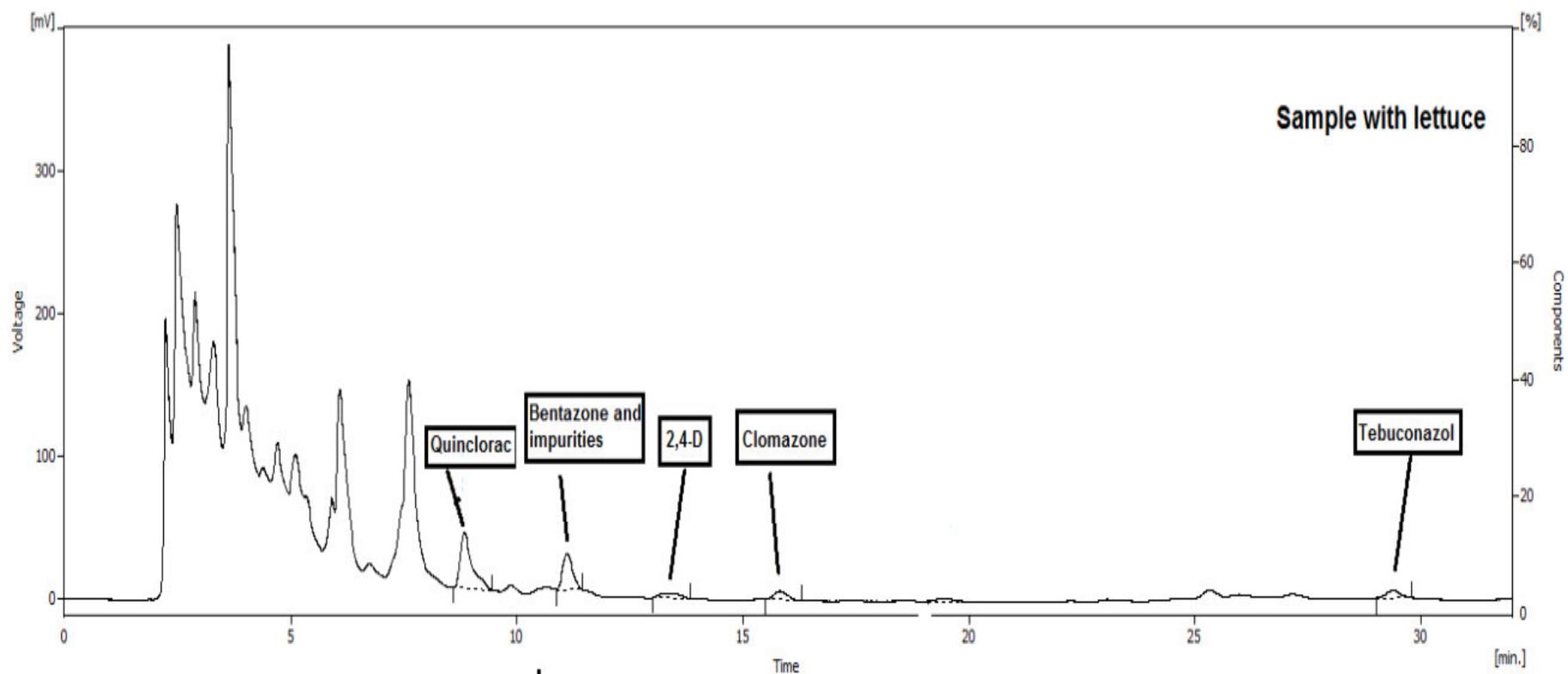


Figure 3. Sample with lettuce collected on the fourteenth day.

For 2,4-D and clomazone maximum degradation occurred in the second week. Probably, unlike quinclorac and tebuconazole, there was phytodegradation these herbicides through metabolism by the same enzyme systems active in lettuce. This explains why the concentrations of pesticides continued to decline even after the death of some plants and necrosis of leaves.

Some xenobiotics might easily be taken up by plants. Besides uptake, the presence and activity of a network of detoxification enzymes is crucial for metabolization and eventually degradation of the chemicals under consideration (SCHRÖDER *et al.*, 2008). Plant roots and leaves have been described to make detoxification for organic xenobiotics, predominantly herbicides (COLEMAN *et al.*, 2002). Thus, it is possible that the enzyme system of the plant acts metabolizing these compounds transforming them into metabolites which can be excreted. These metabolites can be more or less toxic than the original pesticide, however, studies are needed to determine the actual mechanism of phytoremediation.

4 Conclusion

This work showed that the hydroponic cultivation of lettuce can be an efficient and low cost effective strategy for phytoremediation of the pesticides studied. It is possible to observe that for tebuconazole fungicide and herbicide quinclorac the ideal treatment time was 7 days which was the maximum phytoaccumulation on the plant. For both herbicides 2,4-D and clomazone a 14 days treatment showed excellent results additionally indicating possible degradation by the metabolism of the plant studied.

5. Acknowledgments

We acknowledge the FAPERGS and Unipampa.

6. References

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. **Chemosphere**. v.91, p.869-881, 2013.

ALVARADO, S.; GUÉDEZ, M.; LUÉ-MERÚ, M. P.; NELSON, G.; ALVARO, A.; JESÚS, A. C.; GYULA, Z. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). **Bioresource Technology**. v.99, p.8436-8440, 2008.

AZIZIAN, A.; AMIN, S.; MAFTOUN, M.; EMAM, Y.; NOSHADI, M. Response of lettuce to Cd-enriched water and irrigation frequencies **African Journal of Environmental Science and Technology**. Issue 10, v.5, p.884-893, 2011.

CHENEY, M. A.; FIORILLO, R.; CRIDDLE, R. S. Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Elliptio complanata* measured by calorimetry. **Comp Biochem Physiol**. v.118C, p.159-164, 1997.

COLEMAN, J. O. D.; FROVA, C.; SCHRÖDER, P.; TISSUT, M. Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of persistent herbicides. **Env. Sci. Poll. Res**. v.9, p.18-28, 2002.

DOSNON-OLETTE, R. C., M.; EULLAFFROY, P. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.72, p.2096-2101, 2009.

EAPEN, S.; SINGH, S.; D'SOUZA, S. F. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. **Biotechnol. Adv**. v.25, p.442-451, 2007.

FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.85, p.7-14, 2006.

GERHARDT, K. E.; HUANG, X.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and Challenges. **Plant Science**. v.176, p.20-30, 2009.

GROSSMANN, K. Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. **Weed Science**. v.46, p.707-716, 1998.

HE, Z.; JIANGCHUAN, L.; HALYAN, Z.; M., M. Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in lactuca sativa. **Plant. Sci.** v.168, p.309-318, 2005.

HUTCHINSON, S. L. **A Study on the Accumulation of Perchlorate in Young Head Lettuce** U.S. Environmental Protection Agency. Manhattan: September 2004 2004.

KARAVANGELI, M.; LABROU, N. E.; CLONIS, Y. D.; TSAFTARIS, A. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathioneS-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. **Biomolecular Engineering.** v.22, p.121-128, 2005.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente.** p.9-18, 2007.

ÖNNEBY, K.; JONSSON, A.; STENSTRÖM, J. A New Concept for Reduction of Diffuse Contamination by Simultaneous Application of Pesticide and Pesticide-degrading Microorganisms. **Biodegradation.** Issue 1, v.21, p.21, 2009.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.56, p.15-39, 2005.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MENEZES, C.; MORAES, B. S.; REINCHE, G. B.; ZANELLA, R.; AL., E. Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of Leporinus obtusidens. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.74, p.336-341, 2011.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MARTINS, M. L.; MACHADO, L. O. S.; MARCHESAN, E. Risk Assessment of Surface Water Contamination by Herbicide Residues: Monitoring of Propanil Degradation in Irrigated Rice Field Waters Using HPLC-UV and Confirmation by GC-MS. **J. Braz. Chem. Soc.** v.18, p.585, 2007.

QUE-HEE, S. S. **The phenoxyalkanoic herbicides: chemistry analysis and environmental pollution:** CRC Press. Inc. Boca Raton, FL., 1981.

RESENDE, F. V.; SAMINEZ, T. C. O.; VIDAL, M. C.; SOUZA, R. B.; CLEMENTE, F. M. V. **Cultivo de Alface em Sistema Orgânico de Produção.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Nota Técnica. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças 2007.

ROBLES-GONZÁLEZ, I.; RÍOS-LEAL, E.; FERRERA-CERRATO, R.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RINDERKENECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H. M.

Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: Effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. **Process Biochemistry**. v.41, p.1951-1960, 2006.

ROEHRS, R.; ROEHRS, M.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R. Biodegradation of Herbicide Propanil and Its Subproduct 3,4-Dichloroaniline in Water. **Clean – Soil, Air, Water**. Issue 9, v.40, p.958-964, 2012.

RURAL, R. G. **Vida na Fazenda: Alfafa, como plantar.**: Editora Globo 2010.

SANDERS, H. O. Toxicity of pesticides to the crustacean *Gammarus lacustris*. **Technical Papers of the Bureau of Sport Fisheries and Wildlife**. v.25, 1969.

SCHRÖDER, P.; COLLINS, C. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. **Int. J. Phytorem.** v.4, p.247-265, 2002.

SCHRÖDER, P.; DAUBNER, D.; MAIER, H.; NEUSTIFTER, J.; DEBUS, R. Phytoremediation of organic xenobiotics - Glutathione dependent detoxification in Phragmites plants from European treatment sites. **Bioresource Technology**. v.99, p.7183-7191, 2008.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Pesticidas & Ambiente. **Embrapa Informações Tecnológicas**. p.145-192, 2004.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**: Porto Alegre - RS, 2010.

VILLALOBOS, A. R.; DUNNICK, C. A.; PRITCHARD, J. B. Mechanism mediating basolateral transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat kidney. **J. Pharmacol Exp Ther**. v.9, p.278-582, 1996.

YANG, X.; FENG, Y.; HE, Z.; STOFFELLA, P. J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.18, p.339-353, 2005.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta dissertação, os resultados obtidos foram divididos em dois manuscritos, os quais serão submetidos a revistas científicas da área.

No manuscrito 1 foi desenvolvido e validado um método multirresidual para a determinação de seis herbicidas recomendados para o cultivo de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. São eles o quincloraque, bentazone, 2,4-D, clomazone, propanil e tebuconazol. O método desenvolvido mostrou-se eficiente para a determinação dos mesmos em água de torneira apresentando boas porcentagens de recuperação e precisão. Na água utilizada no cultivo hidropônico observou-se um interferente oriundo dos nutrientes utilizados para cultivo, o que inviabilizou a quantificação do herbicida bentazone. No entanto, foi possível validar o método para os demais cinco pesticidas obtendo-se resultados satisfatórios.

O método de extração por SPE mostrou-se eficiente e adequado como pode ser observado pelas boas porcentagens de recuperação que variaram entre 78 e 110% para o cartucho Strata C18 ® ficando dentro da faixa recomendada para pesticidas (SANCO, 2009). No entanto, o cartucho Strata X ® não se mostrou adequado para a extração deste tipo de compostos.

Acreditamos que isso ocorra devido à interação muito forte dos pesticidas ao cartucho strata X considerando a maior polaridade do material de recheio, fazendo com que os analitos não sejam eluídos com os solventes utilizados. A estrutura do material de recheio de cada um dos cartuchos é mostrada na figura 21.

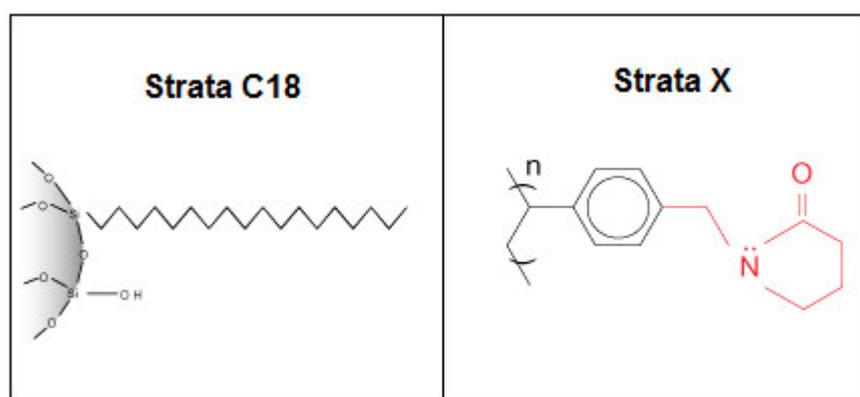


Figura 21. Estrutura do material de recheio dos cartuchos Strata C18 ® e Strata X ®.
FONTE: Phenomenex.

Desta forma, o método desenvolvido mostrou-se uma ferramenta útil para a avaliação da presença de seis pesticidas em água potável, e de cinco no caso do monitoramento de pesticidas em cultivo hidropônico.

Neste trabalho o método foi empregado para a avaliação do potencial de fitorremediação da alface com bons resultados, tendo ainda potencial para aplicação em estudos futuros de fitorremediação em águas com novas plantas ou até mesmo em outras matrizes com os devidos ajustes na forma de extração.

No manuscrito 2 avaliamos o potencial de fitorremediação da alface para os herbicidas quincloraque, 2,4-D, clomamoze e propanil, assim como, para o fungicida tebuconazol.

Para o experimento as plantas foram fixadas em isopores e cultivadas em potes de plástico contendo a solução nutriente conforme apresentado na figura 22.



Figura 22. Plantas de alface na primeira semana da aplicação dos pesticidas.

Para simular a luz solar foi utilizado um conjunto de lâmpadas fluorescentes nas cores vermelha, azul, branca e amarela, além de uma incandescente.

Foi possível observar um decréscimo nas concentrações dos pesticidas quincloraque e tebuconazol nos primeiros sete dias de experimento, porém após 14 dias suas respectivas concentrações voltaram a aumentar o que nos leva a crer que estas substâncias foram fitoacumuladas pela planta e a partir da segunda semana com a necrose de folhas os mesmos voltaram para o meio aquoso. Desta forma, semelhante ao mostrado em trabalhos com Arsênio em plantas aquáticas (ALVARADO *et al.*, 2008).



Figura 23. Necrose de folhas na segunda semana do experimento.

Para os herbicidas 2,4-D e clomazone, conforme discutido no manuscrito 2, obtivemos decréscimo das concentrações até o décimo-quarto dia. Como não houve aumento das concentrações após a necrose de parte das plantas, acreditamos que os mesmos possivelmente foram degradados.

Conforme artigos da literatura, observamos que ambos os herbicidas tem em comum a possibilidade de sofrer reações de hidroxilação aromática em sua estrutura química durante o seu metabolismo em plantas, podendo ainda sofrer reações de metabolismo secundário (TENBROOK e TJEERDEMA, 2006). No entanto, seria

necessário analisar estes metabólitos, tanto em água quanto na planta, para comprovarmos que esta hipótese se aplica também à alface, já que não sabemos se a planta possui as isoformas de enzimas que são capazes de realizar este tipo de reação para estes compostos.

Quanto ao herbicida propanil, observamos uma degradação total do mesmo que ocorreu também no controle, porém, quando comparados cromatogramas de amostras controle (só com o meio de cultivo) e as com alface, observamos nas de controle a presença de um pico entre os herbicidas bentazone e clomazone, que conforme trabalho ainda não publicado do nosso grupo, pode indicar a presença do metabólito do propanil, 3,4-DCA, devido a sua ordem de eluição em relação aos demais pesticidas (Figura 24).

Este mesmo pico não é observado no cromatograma onde havia alface, (Figura 25), o que pode sugerir um mecanismo de degradação diferente, e que pode ser muito promissor pela ausência deste metabólito altamente tóxico.

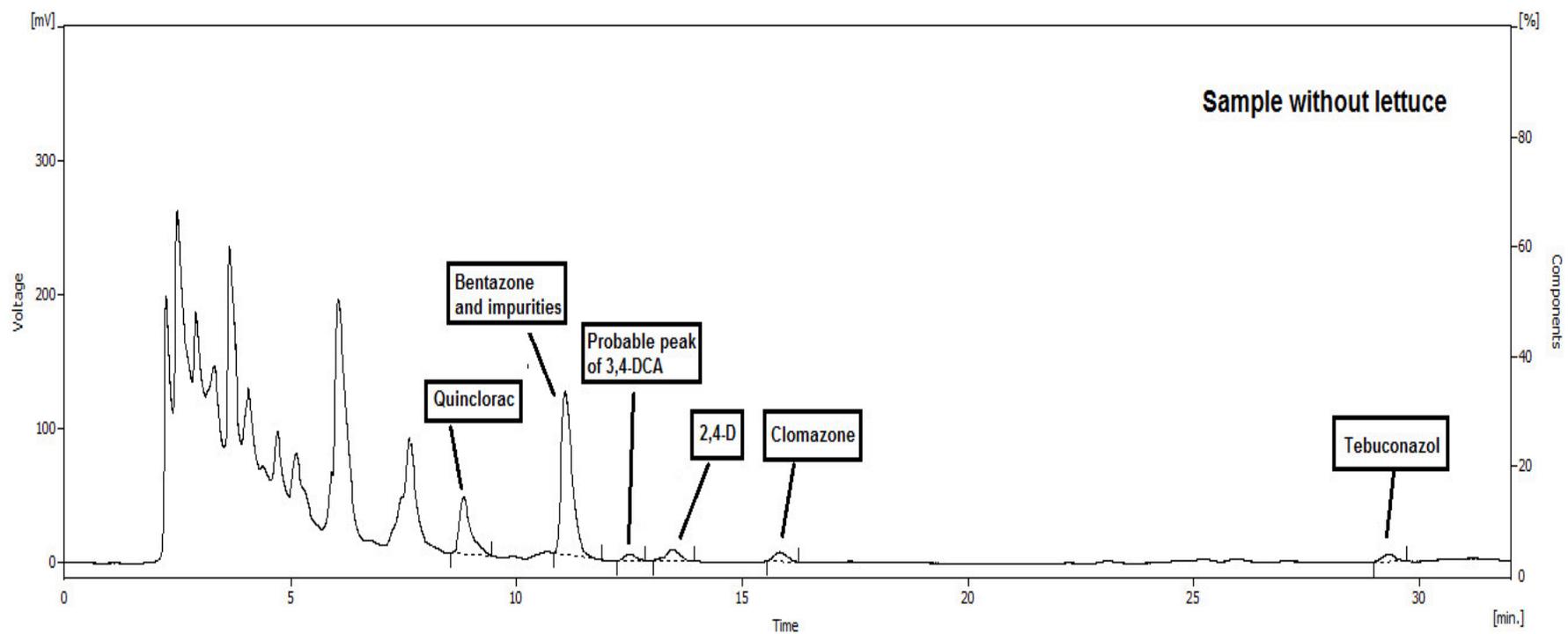


Figura 24. Cromatograma de amostra de água com nutrientes fortificada com pesticidas sem o cultivo de alface.

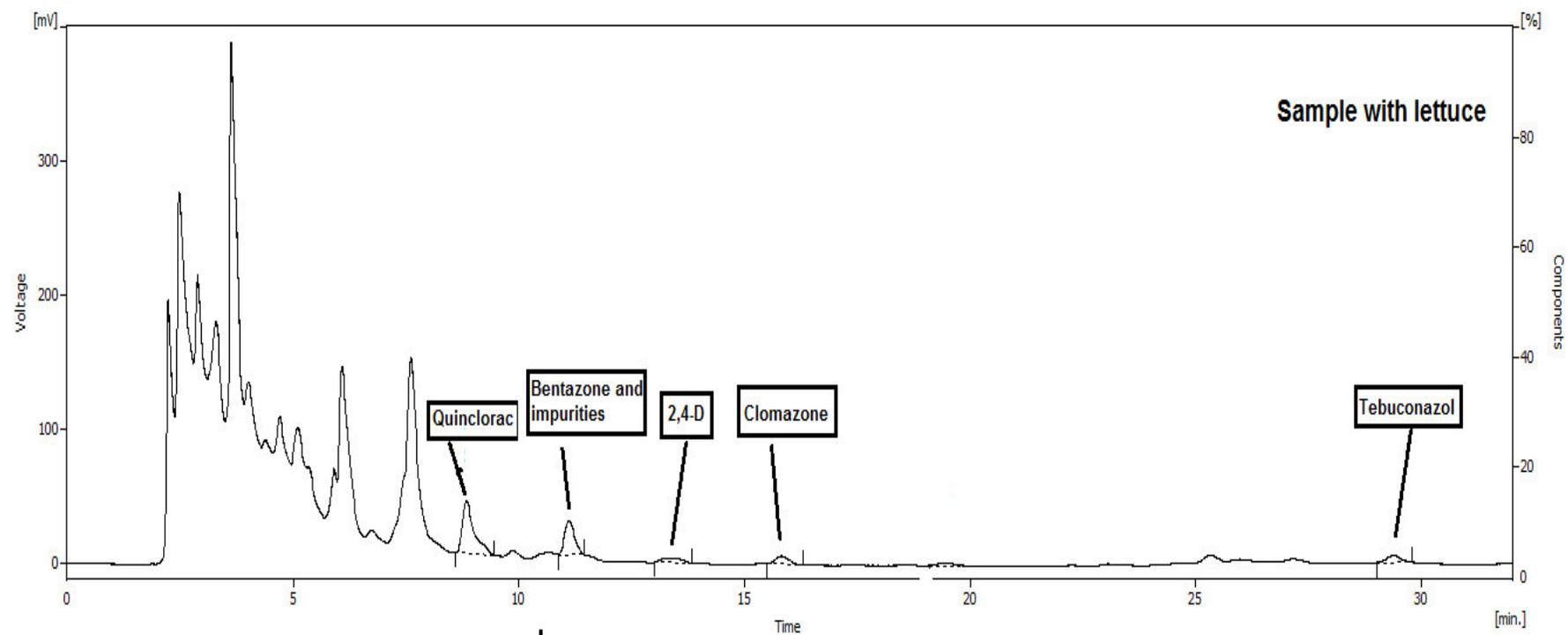


Figura 25. Cromatograma de amostra de água e nutrientes fortificada com pesticidas onde foi cultivada alface.

No entanto, não pudemos verificar se trata-se realmente do 3,4-DCA devido a não possuímos um padrão do mesmo.

Desta forma, com o método validado apresentado no manuscrito 1 e os resultados alcançados no manuscrito 2, obtivemos resultados promissores que poderão ser melhor elucidados e aprimorados em trabalhos posteriores.

A seguir, na conclusão desta dissertação, apresentaremos algumas perspectivas de trabalhos futuros a partir do que foi desenvolvido e discutido até aqui.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método multirresidual para a determinação de pesticidas recomendados e amplamente utilizados no cultivo de arroz irrigado. Foi possível validar o método para determinação de seis pesticidas em água potável e cinco em meio de cultivo hidropônico. O método mostrou-se eficiente e com ótimas exatidão e precisão, além do baixo custo se comparado com outras técnicas como LC-MS.

O método ainda apresenta boa versatilidade e possibilita a inclusão de novos pesticidas e/ou metabólitos tornando esta metodologia ainda mais útil para aplicações no controle de qualidade de águas, assim como em estudos de biodegradação e fitorremediação.

No estudo de fitorremediação obtivemos resultados promissores para a fitorremediação dos pesticidas avaliados com provável fitoacumulação do quincloraque e tebuconazol e possível degradação dos herbicidas 2,4-D e clomazone.

Por fim, acreditamos que os resultados obtidos abrem inúmeras possibilidades de aplicação da alface como fitorremediadora, assim como, perspectivas de trabalhos futuros que podem aprimorar e ampliar os avanços obtidos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Algumas perspectivas futuras são:

- a) Inclusão de novos pesticidas e metabólitos no método de determinação desenvolvido;
- b) Avaliação do potencial de fitorremediação do cultivo hidropônico de alface para outros pesticidas;
- c) Desenvolvimento e validação de método que possibilite a quantificação dos pesticidas avaliados e seus metabólitos na planta para verificar a acumulação e/ou degradação dos mesmos;
- d) Desenvolvimento e validação de método de extração que possibilite a avaliação e estudos de fitorremediação de pesticidas em solo;
- e) Avaliação do potencial de fitorremediação de outras plantas, inclusive plantas nativas da região para os herbicidas avaliados e novos pesticidas que possam ser incluídos na metodologia desenvolvida.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. **Chemosphere**. v.91, p.869-881, 2013.

ALVARADO, S.; GUÉDEZ, M.; LUÉ-MERÚ, M. P.; NELSON, G.; ALVARO, A.; JESÚS, A. C.; GYULA, Z. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). **Bioresource Technology**. v.99, p.8436-8440, 2008.

AMARANTE JR., O. P.; ASTROM, O. Validação de Métodos Analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.** v.12, p.116-131, 2001.

ANVISA. **ANVISA - Monografias de Agrotóxicos**: ANVISA. 2013 2013.

ARMSTRONG, R. N. Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases. **Curr Opin Chem Biol**. v.2, p.618-623, 1998.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia** 2003.

AZIZIAN, A.; AMIN, S.; MAFTOUN, M.; EMAM, Y.; NOSHADI, M. Response of lettuce to Cd-enriched water and irrigation frequencies **African Journal of Environmental Science and Technology**. Issue 10, v.5, p.884-893, 2011.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**: UFV. Viçosa, 2004.

BARCELÓ, D. Occurrence, handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment. A review. **Analyst**. v.116, p.681-689, 1991.

BRASIL. ANVISA: Resolução RE 899. 2003.

_____. ANVISA - RDC N. 274, de 22 de setembro de 2005., 2005.

BRAZIER, M.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. O-Glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). **Phytochemistry**. v.59, p.149-156, 2002.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégias e Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. v.13, p.129-146, 2003.

BRONDI, S. H. G.; LANÇAS, F. M. Development and validation of a multi-residue analytical methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography **J. Braz. Chem. Soc.** v.16, p.650-653, 2005.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**. v.665, p.55-62, 2010.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais técnicas de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de díodos e espectrometria de massas. **Química Nova**. p.1604-1617, 2011.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **J. Chromatography B**. v.689, p.175-180, 1997.

CAZORLA-REYES, R.; FERNÁNDEZ-MORENO, J. L.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**. v.85, p.183-196, 2011.

CERDEIRA, A. L. E. A. Metodologia Analítica de Resíduos do Herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em amostras de água em área de cultivo de cana-de-açúcar. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. v.12, p.99-110, 2002.

CEREJEIRA, M.; PEREIRA, T.; SILVA-FERNANDES, A. Use of new microbiotests with *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum* immobilized forms. **Chemosphere**. v.37, p.2949-2955, 1998.

CHAKRABORTY, R.; MUKHERJEE, S. Kinetic Studies of Chromium Phytoremediation for Polishing Treated Tannery Effluent by Water Lettuce (*Pistia Stratiotes*). **Asian J. Exp. Biol. Sci.** Issue 2, v.4, p.179-184, 2013.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**. Issue 1, v.11, p.1-6, 1998.

CHAVES, P. A.; LAIRD, L. M.; SUTHERLAND, R.; BELTRAO, J. Assessment of fish culture water improvement through the integration of hydroponically grown lettuce. **Water Science and Technology**. v.42, p.43-47, 2000.

CHENEY, M. A.; FIORILLO, R.; CRIDDLE, R. S. Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Elliptio complanata* measured by calorimetry. **Comp Biochem Physiol**. v.118C, p.159-164, 1997.

CHINGOMBE, P.; SAHA, B.; WAKEMAN, R. J. Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. **J. Colloid Interface Sci.** **297**. p.434-442, 2006.

COLEMAN, J. O. D.; FROVA, C.; SCHRÖDER, P.; TISSUT, M. Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of persistent herbicides. **Env. Sci. Poll. Res.** v.9, p.18-28, 2002.

CORSINI, E.; CODECÁ, I.; MANGIARATTI, S.; BIRINDELLI, S.; MINOIA, C.; TURCI, R.; VIVIANI, B.; FACCHI, A.; VITELLI, N.; LUCCHI, L.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M.; COLOSIO, C. Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure. **Toxicology and Applied Toxicology**. v.222, p.202-210, 2007.

DG-SANCO, E. C. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. p.3131, 2007.

DIXON, D.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biol.** p.3004.1-3004.10, 2002.

DIXON, D. P.; CUMMINS, I.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. **Curr Opin Plant Biol.** v.1, p.258-266, 1998.

DOSNON-OLETTE, R.; COUDERCHET, M.; EULLAFFROY, P. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.72, p.2096-2101, 2009.

DOSNON-OLETTE, R. C., M.; EULLAFFROY, P. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.72, p.2096-2101, 2009.

EAPEN, S.; SINGH, S.; D'SOUZA, S. F. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. **Biotechnol. Adv.** v.25, p.442-451, 2007.

EDWARDS, R.; DIXON, D. P.; WALNOT, V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. **Trends Plant Sci.** v.5, p.193-198, 2000.

EEC, E. D. W. D. **EEC Directive 86/363/EEC (MRLs for foodstuffs of animal origin) and Directive 90/642/EEC (MRLs for foodstuffs of vegetal origin)**. European Union, Brussels: EEC 1980.

EMBRAPA. **Cultivo de Arroz Irrigado no Brasil**. E. C. Temperado: Embrapa Clima Temperado. 2013 2010.

EPA. **2,4-D Red Facts.**, 2005.

FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.85, p.7-14, 2006.

FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIerno, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety** **69**. p.416-420, 2008.

FONT, G.; MANES, J.; MOLTÓ, J. C.; PICÓ, Y. Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water. **Journal of Chromatography A**. v.642, p.135-161, 1993.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, R. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography A**. v.686, p.77-83, 1996.

FRENICH, A. G. E. A. Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of Chromatography A**. v.1216, p.4798-4808, 2009.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**. Issue 1, v.29, p.105-112, 2006.

GARP. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**. Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, 1999.

GERHARDT, K. E.; HUANG, X.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and Challenges. **Plant Science**. v.176, p.20-30, 2009.

GHANNOUM, M.; RICE, L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** v.12, p.501-517, 1999.

GROSSMANN, K. Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. **Weed Science**. v.46, p.707-716, 1998.

Hajslová, J.; Holadová, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempný, M. Matrix-Induced Effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticides residues. **Journal of Chromatography A**. Issue 2, v.800, p.283-295, 1998.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**: LTC. Rio de Janeiro, 2012.

HE, Z.; JIANGCHUAN, L.; HALYAN, Z.; M., M. Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in lactuca sativa. **Plant. Sci.** v.168, p.309-318, 2005.

HUBER, R.; OTTO, S. Environmental behavior of bentazone herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v.137, p.111-134, 1994.

HUTCHINSON, S. L. **A Study on the Accumulation of Perchlorate in Young Head Lettuce** U.S. Environmental Protection Agency. Manhattan: September 2004 2004.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.**, 2007.

JUNKER-BUCHHEIT, A.; WITZENBACHER, M. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.737, p.67-74, 1996.

KARAVANGELI, M.; LABROU, N. E.; CLONIS, Y. D.; TSAFTARIS, A. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathioneS-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. **Biomolecular Engineering**. v.22, p.121-128, 2005.

KESKINEN, I. A.; BURKE, A.; ANNOUS, B. A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**. v.132, p.134-140, 2009.

KJAERSTAD, M. B.; TAXVIG, C.; NELLEMAN, C.; VINGGAARD, A. M.; ANDERSEN, H. R. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. **Reprod. Toxicol.** v.30, p.573-582, 2010.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. p.9-18, 2007.

LAMOUREUX, G. L.; RUSNESS, D. G. Quinclorac Absorption, Translocation, Metabolism, and Toxicity in Leafy Spurge (*Euphorbia esula*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.53, p.210-226, 1995.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos.**: RiMa. São Carlos, 2004.

LI, Z.; SHAO, T.; MIN, H.; LU, Z.; XU, X. Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac. **Soil Biology & Biochemistry** v.41, p.984-990, 2009.

LÓPEZ, F. J.; PITARCH, E.; EGEA, S.; BELTRAN, J.; HERNÁNDEZ, F. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**. v.433, p.217-226, 2001.

MCKINLAY, R.; PLANT, J. A.; BELL, J. N. B.; VOULVOULIS, N. Endocrine disrupting pesticides: implication for risk assessment. **Environ. Int.** v.34, p.168-183, 2008.

MELO, A.; AGUIAR, A.; MANSILHA, C.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce. **Food Chemistry**. v.130, p.1090-1097, 2012.

MENEGOLA, E.; BROCCIA, M. I.; DI RENZO, F.; GIAVINI, E. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphic effects. **Reprod. Toxicol.** v.22, p.186-195, 2006.

MIYAUCHI, T.; MORI, M.; ITO, K. Application of solid-phase extraction to quantitatively determine cyproconazole and tebuconazole in treated wood using liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**. v.1063, p.137-141, 2005.

NIELL, S.; PAREJA, L.; ASTEGGIANTE, L. G.; ROEHRS, R.; PIZZUTTI, I. R.; C., G.; HEINZEN, H.; CESIO, M. V. Development of Methods for Multiresidue Analysis of Rice Post-Emergence Herbicides in Loam Soil and Their Possible Applications to Soils of Different Composition. **Journal of AOAC International**. Issue 2, v.93, p.425-431, 2010.

NIESSEN, W. M. A. Group-specific fragmentation of pesticides and related compounds in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1217, p.4061-4070, 2010.

OLIVEIRA, M.; USALL, J.; VINAS, I.; ANGUERRA, M.; GATIUS, F.; ABADIAS, M. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. **Food Microbiology**. v.27, p.679-684, 2010.

ÖNNEBY, K.; JONSSON, A.; STENSTRÖM, J. A New Concept for Reduction of Diffuse Contamination by Simultaneous Application of Pesticide and Pesticide-degrading Microorganisms. **Biodegradation**. Issue 1, v.21, p.21, 2009.

PALMA, G.; SÁNCHEZ, A.; OLAVE, Y.; ENCINA, F.; PALMA, R.; BARRA, R. Pesticide levels in surface waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**. v.57, p.763-770, 2004.

PEIXOTO, S. C. **Estudo da estabilidade a campo dos pesticidas Carbofurano e Quincloraque em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD**: Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **J. Biochem. Biophys. Methods**. v.70, p.117, 2007.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.56, p.15-39, 2005.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos Constituintes Químicos dos Extratos de Diferentes Matrizes na Resposta Cromatográfica de Agrotóxicos. **Química Nova**. Issue 4, v.33, p.909-913, 2010.

EPA. **Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites**. 2001.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MENEZES, C.; MORAES, B. S.; REINCHE, G. B.; ZANELLA, R.; AL., E. Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.74, p.336-341, 2011.

PRIMEL, E. G. **Aplicação de extração por fase sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório.** PPGQ UFSM, Santa Maria, RS, 2003. 169 p.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo de arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**. Issue 4, v.28, p.605-609, 2005.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MARTINS, M. L.; MACHADO, L. O. S.; MARCHESAN, E. Risk Assessment of Surface Water Contamination by Herbicide Residues: Monitoring of Propanil Degradation in Irrigated Rice Field Waters Using HPLC-UV and Confirmation by GC-MS. **J. Braz. Chem. Soc.** v.18, p.585, 2007.

QUE-HEE, S. S. **The phenoxyalkanoic herbicides: chemistry analysis and environmental pollution:** CRC Press. Inc. Boca Raton, FL., 1981.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. Issue 1, v.24, p.68-76, 2001.

RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H. Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes. **Chemosphere** **83**. p.633-646, 2011.

RENÉ VAN DER HOFF, R.; ZONEN, P. V. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.843, p.301-322, 1999.

RESENDE, F. V.; SAMINEZ, T. C. O.; VIDAL, M. C.; SOUZA, R. B.; CLEMENTE, F. M. V. **Cultivo de Alface em Sistema Orgânico de Produção.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Nota Técnica. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**. v.27, p.771-780, 2004.

RIBANI, M. E. A. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. p.771-780, 2004.

ROBLES-GONZÁLEZ, I.; RÍOS-LEAL, E.; FERRERA-CERRATO, R.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RINDERKENECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H. M. Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: Effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. **Process Biochemistry**. v.41, p.1951-1960, 2006.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução a química ambiental**.: Bookman. Porto Alegre, 2004.

RODRIGUES, A. M.; FERREIRA, V.; CARDOSO, V. V.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J. Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1150, p.267-278, 2007.

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**. v.678, p.82-89, 2010.

ROEHRS, R.; PIZZUTTI, I. R.; ADAIME, M. B.; PAREJA, L.; NIELL, S.; CESIO, M. V.; HEINZEN, H. Liquid Chromatographic-Diode-Array Detection Multiresidue Determination of Rice Herbicides in Drinking and Paddy-Field Water. **Journal of AOAC International**. Issue 4, v.92, p.1190-1195, 2009.

ROEHRS, R.; ROEHRS, M.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R. Biodegradation of Herbicide Propanil and Its Subproduct 3,4-Dichloroaniline in Water. **Clean – Soil, Air, Water**. Issue 9, v.40, p.958-964, 2012.

RURAL, R. G. **Vida na Fazenda: Alface, como plantar**.: Editora Globo 2010.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; MARTÍN, G.; TADEO, J. L. Determination of Pesticide Residues by GC-MS Using Analyte Protectants to Counteract the Matrix Effect. **Anal. Sci**. Issue 11, v.21, p.129, 2005.

SÁNCHEZ-ORTEGA, A.; SAMPEDRO, M. C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main

metabolites in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**. v.1094, p.70-76, 2005.

SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. p.Document N SANCO /12495, 2009.

SANDERS, H. O. Toxicity of pesticides to the crustacean *Gammarus lacustris*. **Technical Papers of the Bureau of Sport Fisheries and Wildlife**. v.25, 1969.

SCHRÖDER, P.; COLLINS, C. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. **Int. J. Phytorem.** v.4, p.247-265, 2002.

SCHRÖDER, P.; DAUBNER, D.; MAIER, H.; NEUSTIFTER, J.; DEBUS, R. Phytoremediation of organic xenobiotics - Glutathione dependent detoxification in *Phragmites* plants from European treatment sites. **Bioresource Technology**. v.99, p.7183-7191, 2008.

SCHRÖDER, P.; NAVARRO-AVINÓ, J.; AZAIZEH, H.; GOLDBIRSH, A. G.; DIGREGORIO, S.; KOMIVES, T.; LANGERGRABER, G.; LENZ, A.; MAESTRI, E.; MEMON, A. R.; RANALLI, A.; SEBASTIANI, L.; SMRCEK, S.; VUILLEUMIER, S.; WISSING, F. Using phytoremediation technologies to upgrade waste water treatment in Europe. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, p.490-497, 2007.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Pesticidas & Ambiente. **Embrapa Informações Tecnológicas**. p.145-192, 2004.

SLOBODNÍK, J. E. A. Monitoring of organic micropollutants in surface water by automated on-line trace-enrichment liquid and gas chromatographic systems with ultraviolet diode-array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v.768, p.239-258, 1997.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**: Porto Alegre - RS, 2010.

SPADOTTO, E. A. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: Princípios e recomendações**. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: Princípios e recomendações. E. M. Ambiente. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente: 29 p. 2004.

STIBOROVÁ, M.; SCHMEISER, H. H.; FREI, E. Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a comparative study. **Phytochemistry**. v.54, p.353-362, 2000.

STILL, G. G. Metabolic fate of 3,4-dichloropropionanilide in plants: the metabolism of the propionic Acid moiety. **Plant Physiol.** v.43, p.543-546, 1968a.

STILL, G. G. Metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants: the metabolic fate of the 3,4-dichloroaniline moiety. **Science.** Issue 3818, v.159, p.992-993, 1968b.

STREAT, M.; HORNER, D. J. Adsorption of highly soluble herbicides from water using activated carbon and hypercrosslinked polymers. **Transactions of the Institute of Chemical Engineers, Part B.** v.78, p.363-382, 2000.

STRICKLAND, T. C.; POTTER, T. L.; JOO, H. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. **Pest management Science** 60. p.703-709, 2004.

TENBROOK, P. L.; TJEERDEMA, R. S. Biotransformation of Clomazone in rice (*Oryza sativa*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*). **Pesticide Biochemistry and Physiology.** v.85, p.38-45, 2006.

TULLY, D. B.; BAO, W.; GOETZ, A. K.; BLYSTONE, C. R.; REN, H.; SCHIMID, J. E.; STRADER, L. F. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.215, p.260-273, 2006.

UNIJUÍ. **ALFACE.** 2013 2013.

VEIGA, 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, p.2391-2399, 2006.

VICARI, M. C. **Determinação de Bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD.** PPGQ - Programa de Pós-Graduação em Química, UFSM, Santa Maria, 2009. 110 p.

VILLALOBOS, A. R.; DUNNICK, C. A.; PRITCHARD, J. B. Mechanism mediating basolateral transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat kidney. **J. Pharmacol Exp Ther.** v.9, p.278-582, 1996.

WANG, C.; WU, Q.; WU, C.; WANG, Z. Application of dispersion-solidification liquid-liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Hazardous Materials.** v.185, p.71-76, 2011.

YANG, X.; FENG, Y.; HE, Z.; STOFFELLA, P. J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.** v.18, p.339-353, 2005.

YIH, R. Y.; MCRAE, D. H.; WILSON, H. F. Mechanism of selective action of 3',4'-dichloropropionanilide. **Plant Physiol.** v.43, p.1291-1296, 1968.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, F. F.; MARTINS, A. F. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **Journal of Chromatography A.** v.904, p.257-262, 2000.

10. ANEXOS

Tabela 9.2 - Herbicidas registrados e recomendados para o controle de plantas daninhas na cultura do arroz no RS e SC.

Ingrediente ativo	Produto comercial (p.c.)	Formulação ¹ e concentração (g.L ⁻¹ ou kg ⁻¹)	Dose de registro do p. c. (kg ou L.ha ⁻¹)	Época/modo de aplicação ²	Classe toxicológica ³	Classe ambiental ⁴	Intervalo de segurança (dias)
azimsulfuron	Gulliver ⁹	WG 500	10 – 12 g	Pós	III	III	15
bentazon	Basagran 600 ¹⁰	SL 600	1,2 – 1,6	Pós	III	III	60
bispyribac-sodium	Nominee 400 SC ¹²	SC 400	100 – 125 mL	Pós	II	III	118
clefoxydim	Aura ⁶	EC 200	0,75 – 0,85	Pós	I	II	75
clomazone	Gamit	EC 500	0,8 – 1,4	Pré	II	II	NE ⁵
cyhalofop-butyl	Clincher ¹³	EC 180	1,0 – 1,75	Pós	I	II	77
cyclosulfamuron 2,4 –D ⁷	Invest	WG 700	57 g	Pós	II	II	111
	Aminol 806	SL 806	0,5 – 1,5	Pós	I	III	NE
	DMA 806 BR	SL 806	0,3	Pós	I	III	NE
	Herbi D-480	SL 480	0,8 – 2,5	(Pré)/ Pós	I	NA	NE
	U 46 D – Fluid 2,4 – D	SL 720	0,3	Pós	I	III	NE
	Deferon	EC 502	0,6 – 1,2	(Pré)/ Pós	II	NA	NE
ethoxysulfuron	Gladium	WG 600	100 - 133 g	Pós	III	III	50
fenoxaprop-p-ethyl	Starice	EC 69	0,8 – 1,0	Pós	II	II	80
	Whip S	EW 69	0,4 – 1,0	Pós	II	II	80
glyphosate	Glion	SL 480	1,0 – 6,0	Pré (sem)	IV	II	NE
	Roundup Original	SL 480	0,5 – 6,0	Pré (sem)	IV	III	NE

Anexo 1. Herbicidas recomendados para a cultura de arroz. Fonte: SOSBAI 2010

Tabela 9.2 - Herbicidas registrados e recomendados ...

Continuação.

Ingrediente ativo	Produto comercial (p. c.)	Formulação ¹ e concentração (g.L ⁻¹ ou kg ⁻¹)	Dose de (p. c.) (kg ou L.ha ⁻¹)	Época/modo de aplicação ²	Classe toxicológica ³	Classe ambiental ⁴	Intervalo de segurança (dias)
imazapic + imazethapyr	Only ⁸	SL 25 + 75	1,0 – 1,5	Pré (rest [*])/Pós (rest.) ¹⁴	III	III	60
imazapyr+imazapic	Kifix ⁸	WG 525+175	0,140	Pós (rest [*]) ¹⁵	II	III	60
metsulfuron-methyl	Ally ⁹	WG 600	3,3 g	Pós	III	III	30
oxadiazon	Ronstar 250 BR	EC 250	3,0 - 4,0	Pré/Pós	II	III	NE
oxyfluorfen	Goal BR	EC 240	1,0	Pré	III	II	70
pendimethalin	Herbadox	EC 500	2,5 – 3,5	Pré	III	II	NE
penoxsulam	Ricer ¹³	SC 240	0,1 - 0,25	Pré/Pós	II	III	98
propanil	Grassaid	EC 360	8,0 – 10,0	Pós	II	II	80
	Herbipropanin	EC 360	8,0 – 10,0	Pós	I	II	80
	Propanil Fersol 360	EC 360	10,0	Pós	II	II	80
	Propanil Milênia	EC 360	8,0 – 12,0	Pós	I	II	80
	Stam 360	EC 360	10,0	Pós	I	II	80
	Stam 480	EC 480	7,5 – 10,0	Pós	I	II	80

Anexo 2. Pesticidas recomendados para a cultura de arroz, continuação. Fonte: SOSBAI 2010.

Tabela 9.2 - Herbicidas registrados e recomendados ...

Continuação.

Ingrediente ativo	Produto comercial (p. c.)	Formulação ¹ e concentração (g L ⁻¹ ou kg ⁻¹)	Dose de (p. c.) (kg ou L/ha)	Época/modo de aplicação ²	Classe toxicológica ³	Classe ambiental ⁴	Intervalo de segurança (dias)
propanil + thiobencarb	Grassmax	EC 470 + 200	5,0 – 6,0	Pós	IV	I	80
	Satanil EC	EC 200 + 400	6,0 – 8,0	Pós	III	II	80
propanil + triclopyr	Stampir BR	EC 380 + 55,6	6,0 – 10,0	Pós	IV	I	80
pyrazosulfuron-ethyl	Sirius 250	SC 250	60 – 80 mL	Pós	IV	III	30
quinclorac	Facet ¹¹	WP 500	0,75	Pós	III	III	90
thiobencarb	Saturn 500	EC 500	8,0 – 10,0	Pré	II	I	NE

¹SC = suspensão concentrada; SL = concentrado solúvel; EC = emulsão concentrada; EW = emulsão óleo em água; WG = granulado dispersível; WP = pó molhável; ²Pré = pré-emergência; Pós = pós-emergência; Pré (sem) = pré-semeadura do arroz e pós-emergência das plantas daninhas; Pré (rest.)/Pós (rest.) = pré/pós-emergência restrita a cultivares de arroz tolerantes; ³I = extremamente tóxico; II = altamente tóxico; III = medianamente tóxico; IV = pouco tóxico; ⁴I = produto altamente perigoso; II = produto muito perigoso; III = produto perigoso; IV = produto pouco perigoso; NA = não avaliado; ⁵NE = não especificado, devido à modalidade de aplicação; ⁶Doses de 400 a 600 mL/ha de Aura acrescido do adjuvante Dash (500 mL/100 L até 500 mL/ha) controlam capim-arroz; ⁷Utilizar preferencialmente a menor dose, devido ao risco de toxicidade ao arroz. Dose de 200 g e.a./ha de 2,4-D controla angiquinho; ⁸Adicionar o adjuvante Dash (500 mL/100 L); controla arroz-vermelho no estágio de até quatro folhas; ⁹Adicionar óleo mineral emulsionável na concentração de 100 mL/100 L; ¹⁰Adicionar Assist na dose de 1 L/ha nas aplicações terrestres e 300 mL/ha nas aplicações aéreas; ¹¹Adicionar Assist na dose de 1 L/ha; ¹²Acrescentar o espalhante-adesivo Iharaguen-S na concentração de 250 mL/100 L; ¹³Adicionar Óleo vegetal na dose de 1 L/ha; ¹⁴Restrito a utilização em todas as cultivares CL; ¹⁵Restrito a utilização na cultivar Puitá Inta CL, e nos híbridos Sator CL, Apsa CL, Avaxi CL e Inov CL.

Anexo 3. Herbicidas recomendados para a cultura de arroz, continuação. Fonte: SOSBAI 2010.

Anexo 4. Mecanismos de ação, grupos químicos e nomes comerciais de recomendados para arroz irrigado. Fonte: SOSBAI, 2010.

Tabela 9.5 - Mecanismos de ação, grupos químicos e nomes comerciais de recomendados para arroz irrigado.

Mecanismos de ação	Grupos químicos	Herbicidas
a) Auxinas sintéticas	- Ácidos fenoxicarboxílicos - Ácidos quinolinocarboxílicos	- 2,4-D (várias marcas) - Facet
b) Inibidores da ACCase	- Ariloxifenoxipropionatos - Ciclohexanodionas	-Starice, Clincher - Aura
c) Inibidores do fotossistema II	- Amidas - Benzotiadiazinonas	- Propanil (várias marcas) - Basagran
d) Inibidores da ALS	- Imidazolinonas - Sulfoniluréias - Pirimidilbenzoatos -Triazolopirimidina sulfonanilidas	- Only, Kifix - Ally, Gladium, Gulliver, Sirius - Nominee - Ricer
e) Inibidores da EPSPS	- Derivados da glicina	- Glyphosate (várias marcas)
f) Inibidores de PROTOX	- Difeniléteres - Oxadiazolina	- Goal - Ronstar
g) Inibidores da síntese de carotenóides	- Isoxazolidinonas	- Gamit
h) Inibidores do crescimento da parte aérea	- Tiocarbamatos	- Saturn
i) Inibidores da divisão celular (formação de microtúbulos)	- Dinitroanilinas	- Herbadox

Anexo 5. Fungicidas recomendados para a cultura de arroz irrigado. Fonte: SOSBAI, 2010.

Tabela 11.1 - Fungicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado.

NOME COMERCIAL	NOME TÉCNICO	GRUPO QUÍMICO	MODO DE AÇÃO	FORMULAÇÕES CONCENTRAÇÕES (g de i.a./kg ou l)*	DOSE P.C./ha (kg ou l)**	DOENÇAS CONTROLADAS (conforme registro)***
Eminent	Tetraconazol	Triazol	Sistêmico	SC	0,3 – 0,5	Esc, ME, BR, M, Rhs
Priori	Azoxistrobina	Estrobilurina	Sistêmico	SC	0,4	MP, BR
Bim 750 BR	Triciclazol	Benzotiazóis	Sistêmico	PM 750	0,20 – 0,30	BR
Nativo	Trifloxistrobina + Tebuconazol	Estrobilurina + Triazol	Mesostêmico/ Sistêmico	SC	0,5 – 0,75	MP, Esc
Dithiobin 780 PM	Mancozebe + Tiofanato metílico	Ditiocarbamato + Benzimidazol	Sistêmico / Contato	PM 640+140	2,0-2,5	BR; MP
Brio	Kresoxim-metil + Epoxiconazole	Estrobilurina + Triazol	Mesostêmico/ Sistêmico	SC	0,75	MP

As recomendações constantes desta Tabela estão de acordo com as solicitações das Empresas registrantes dos produtos. Indicação e Classe/marca comercial. *Formulações – PM = pó molhável; SC = suspensão concentrada. **PC = produto comercial; ***Recomendações constantes no registro – BR = brusone (*Pyricularia grisea*, *Magnaporthe grisea* – forma perfeita); MP = mancha parda (*Bipolares oryzae*; *Drechslera oryzae* = *Helminthosporium oryzae*); ME = mancha estreita (*Cercospora janseana* = *C. oryzae*, *Sphaerulina oryzina* – forma perfeita); Esc (*Gerlachia oryzae* = *Rhynchosporium oryzae* = *Microdochium oryzae*, *Monographella albescens* – forma perfeita) e Rhs (*Rhizoctonia solani*, *Thanatephorus cucumeris* - forma perfeita).

11. APÊNDICES



Figura 22. Plantas de Alface na primeira semana da aplicação dos pesticidas.



Figura 23. Necrose de folhas após a segunda semana da aplicação dos pesticidas.