

### **3**

## **Materiais e Método**

### **3.1.**

#### **Localização dos pontos de amostragem**

Para pré-estabelecer as regiões de coleta de quatro solos com características distintas (granulometria, mineralogia e origem), foram utilizados mapas geológicos, geomorfológicos e pedológicos. Assim, foram definidos 3 locais para a amostragem.

Uma amostra de solo foi retirada no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, situada em Seropédica, município da Microrregião de Itaguaí. Outras duas coletas foram realizadas no campus da PUC-Rio em Tinguá, onde ocorreu o experimento de campo. O último solo escolhido foi coletado no município de Duque de Caxias, em uma rua vicinal, perpendicular à Avenida Kennedy, cujo acesso é próximo à Casa do Alemão, no km 12 da Rodovia Washington Luiz. As informações referentes à localização e textura das amostras estão explicitadas na Tabela 3.1.

Além das quatro amostras supracitadas, foi coletado uma outra amostra de textura arenosa no campus da UFRRJ, chamado previamente de solo 2, porém o mesmo foi descartada devido as diversas semelhanças com o solo 3.

Após definir preliminarmente as áreas, os pontos de coleta foram determinados a partir de dois fatores principais: facilidade de acesso e características desejadas para cada tipo de solo. A coleta foi realizada seguindo certos cuidados. Foram selecionadas superfícies planas, de forma a facilitar a retirada de amostras indeformadas e minimizar a heterogeneidade do material com escavação de até 40 cm de profundidade, ampliando a área de coleta até atingir o volume desejado. Este volume deve suprir a realização dos ensaios de caracterização, testes de extração e modelagem das amostras para os experimentos de campo.

Tabela 3.1- Localização, coordenadas e textura das amostras

<i>Amostras</i>	<i>Localização</i>	<i>Coordenadas GPS</i>	<i>Textura</i>
1	Seropédica/plantação	22°45'30.040"S, 43°40'55.431"O	Areno-siltosa
3	Tinguá/casa	22°35'28.148"S, 43°24'20.291"O	Areno-siltosa
4	Tinguá/talude	22°35'25.421"S, 43°24'18.416"O	Argilo-arenosa
5	Duque de Caxias	22°41'52.959"S, 43°18'19.126"O	Silte-arenosa

### 3.1.1. Características da amostra 1

A amostra do solo 1 foi retirada das proximidades do campus da UFRRJ, conforme mostrado na Figura 12. A região é constituída por uma formação deposicional, com sedimentos arenosos e siltico-arenosos pela drenagem da Bacia do Rio Guandú. A geomorfologia da região é marcada pelas colinas e depressões assoreadas e pelas planícies colúvio-aluvionares e aluvionares (Goes, 1994).

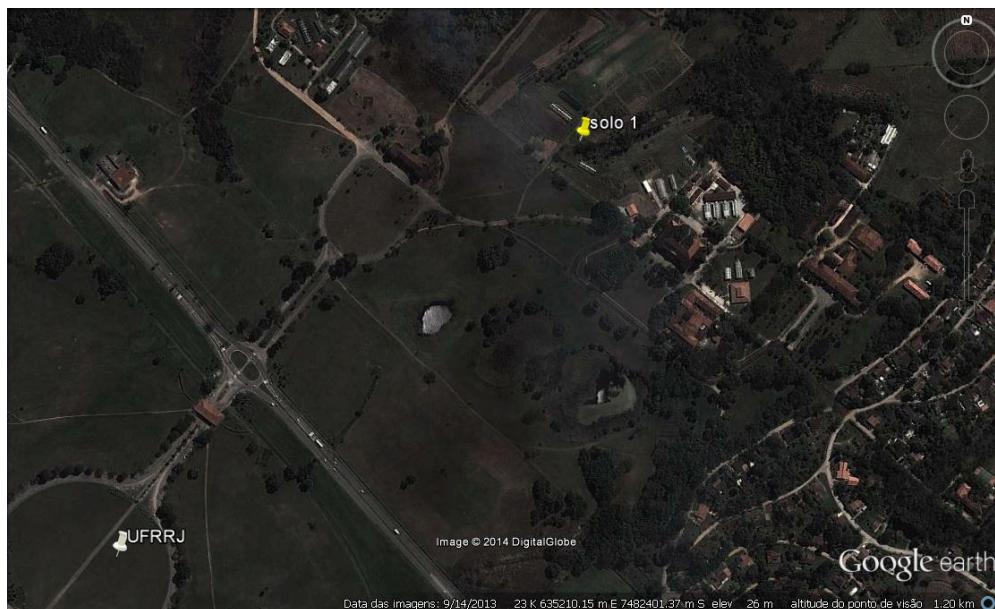


Figura 12- Localização do ponto de coleta do solo 1

A carta de reconhecimento de baixa intensidade dos solos em Seropédica (Embrapa, 2003), indica a presença de planossolos hidromórficos (solo 1), como visto na Figura 13, e argissolos vermelho-amarelos ou amarelos.



Figura 13 - Aspecto geral do ponto de coleta do solo 1

Por apresentar formação sedimentar e terreno bem aplainado, a amostra 01 possui coloração cinza com presença de micro-raízes, devido à sua proximidade de uma das áreas de plantio do campus da UFRRJ. Na percepção tátil, é possível constatar a presença maciça de grãos de areia média e grossa (Figura 13).

### **3.1.2. Características das amostras 3 e 4**

As localizações dos pontos de coleta dos solos 3 e 4, no interior do campus experimental da PUC-Rio, em Tinguá, podem ser verificados na Figura 14. A região caracteriza-se por um relevo montanhoso, extremamente acidentado, transicional entre dois sistemas de relevo. Vertentes predominantemente retilíneas a côncavas, escarpadas e topos de cristais alinhadas, aguçados ou levemente arredondados (CPRM, 2000). Predomínio de amplitudes topográficas superiores a 500 metros e gradientes muito elevados, com ocorrência de colúvios e depósitos

de tálus de grandes espessuras nos talvegues, solos residuais rasos nas partes mais altas e afloramentos de rocha.

Retirado em local de material coluvionar, o solo 3 possui coloração marrom escuro e minerais primários, como a biotita e feldspato em alto grau de alteração. Na percepção tátil-visual também pode-se notar presença considerável de grãos de areia média e grossa, além de um alto teor de matéria orgânica no solo (Figura 15).

O solo 4 de coloração amarelada é proveniente de um talude de poucos metros de altura, visto na Figura 16. Através da análise tátil-visual, nota-se que este solo possui menor teor de quartzo e alta concentração de feldspato, quando comparada as amostras anteriores.

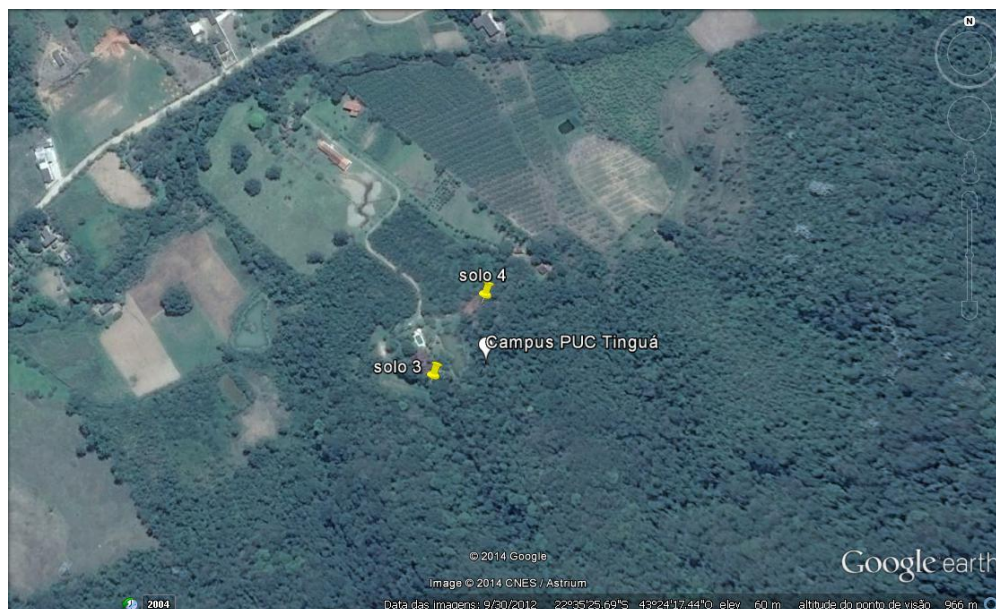


Figura 14 - Localização dos pontos de coleta dos solos 3 e 4



Figura 15 - Aspecto geral do ponto de coleta da amostra 3



Figura 16 - Aspecto geral do ponto de coleta da amostra 4

### 3.1.3. Características da amostra 5

O relevo do local de coleta do solo 5 é típico da Bacia do Rio Iguaçu, onde predominam os terrenos de baixa altitude constituídos por uma planície aluvial de altitude inferior a 20 metros do nível do mar e pequenos morros arredondados cujas cotas raramente ultrapassam 120 metros (DRM, 1981).

A localização do ponto de coleta foi indicada na Figura 17. A amostra é proveniente de uma camada de solo residual jovem pouco espessa, da feição melanocrática, rica em minerais máficos, com destaque para a biotita. Retirado de um talude natural e através da análise tátil-visual, o solo de coloração avermelhada apresenta partículas de quartzo em matriz siltosa, presença de óxido-hidróxido de ferro precipitado e baixo teor de minerais máficos (Figura 18).



Figura 17 - Localização dos pontos de coleta do solo 5



Figura 18 - Aspecto geral do ponto de coleta da amostra 5

#### **3.1.4. Homogeneização dos materiais**

Antes de proceder aos ensaios de caracterização e de quantificação do herbicida, as amostras foram homogeneizadas manualmente, e através do procedimento de quarteamento. A partir do quarteamento foram separadas as amostras representativas do todo para execução destes ensaios. A Figura 19 expõe o processo de quarteamento de um dos solos.

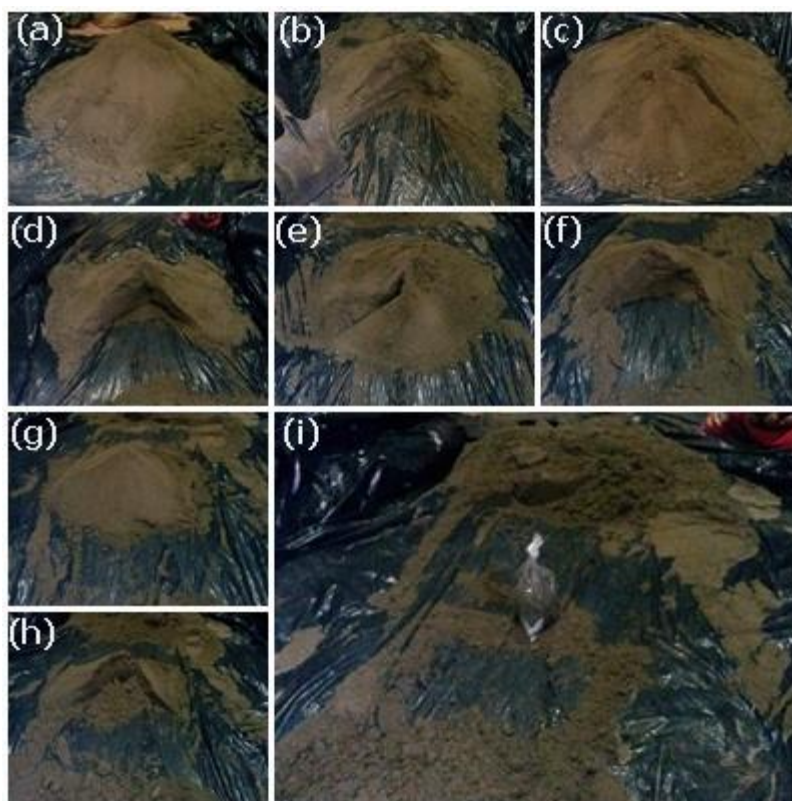


Figura 19 - Sequência do processo de quarteamento do solo 1

### 3.2. Localização do experimento de campo

O experimento de campo deste trabalho aconteceu no campus avançado da PUC-Rio dentro da Reserva Biológica do Tinguá, situada na Estrada da Boa Esperança, número 1050, cujas coordenadas geográficas são 22°35'27.57''S e 43°24'20.62''O.

Foi escolhido este local devido à presença da Estação Meteorológica Automatizada (EMA), modelo *Campbell SCI* (2008, Campbell do Brasil Ltda) que permite monitorar os parâmetros climáticos que influenciam na volatilização do 2,4-D. Este equipamento é um sistema composto por sensores termohigrômetro, anemômetro, cata-ventos, piranômetro e pluviômetro, montados em um tripé, juntamente com uma caixa ambientalmente selada, abrigando um *Datalogger*, e um painel solar para fornecimento de energia (ver Figura 21).



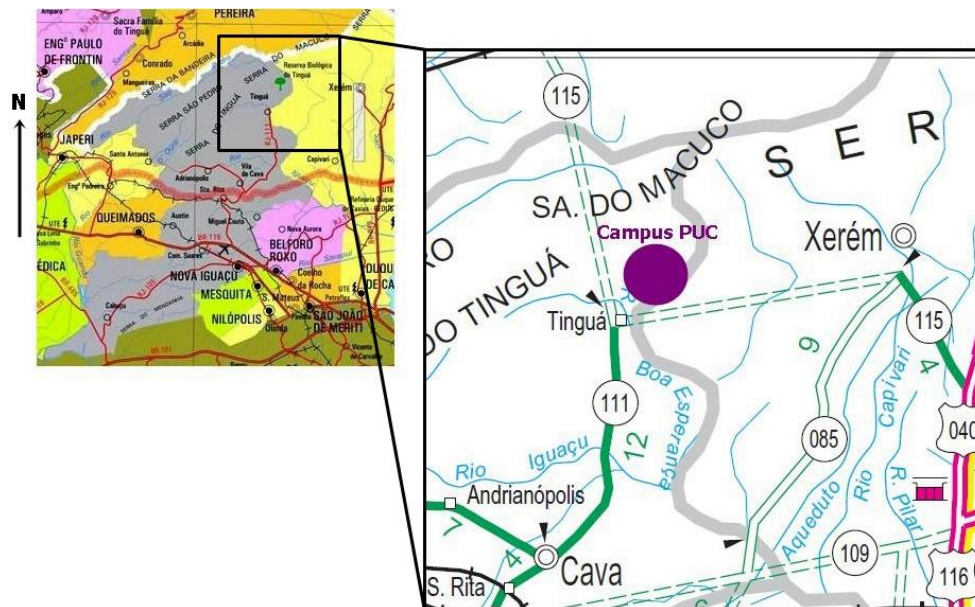


Figura 20 - Mapa de localização do campus avançado da PUC-RIO (adaptado de: Mapa Rodoviário do Estado do Rio de Janeiro, DNIT 2002; Mapa do Rio de Janeiro, CEPERJ 2010)

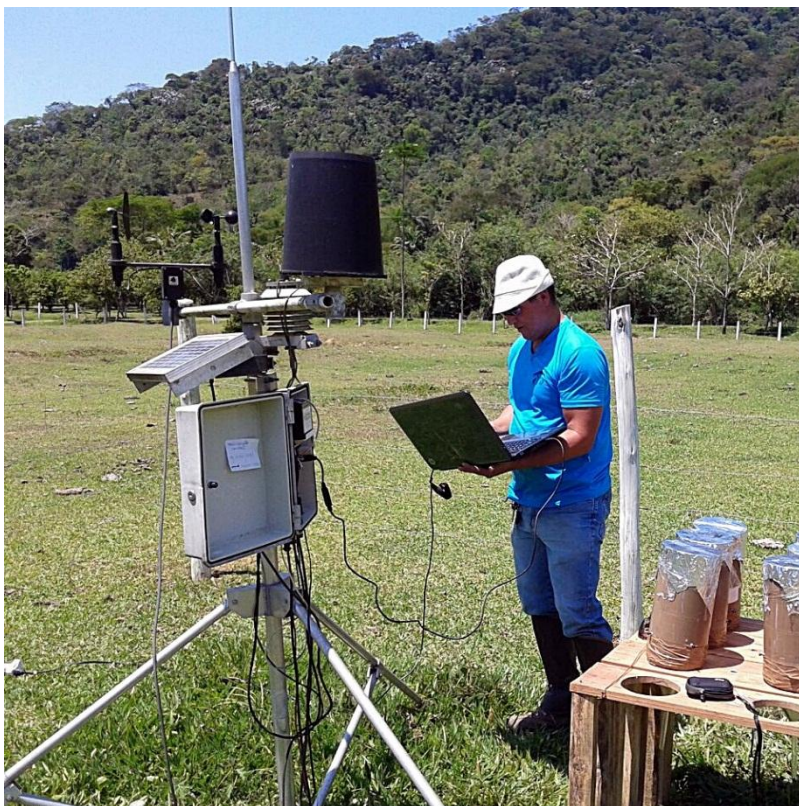


Figura 21 - Estação Meteorológica Automatizada *Campbell SCI*

O sistema armazena a coleta dos dados meteorológicos em intervalos de 5 minutos, sendo o intervalo de escaneamento dos sensores de 10 segundos. Os parâmetros medidos e suas unidades são: velocidade do vento (m/s), direção do vento ( $^{\circ}$ NV), temperatura do ar ( $^{\circ}$ C), umidade relativa do ar (%RH), radiação solar ( $\text{W/m}^{-2}$   $\text{MJ/m}^{-2}$ ) e precipitação (mm).

### **3.3. Programação de ensaios**

Todas as amostras foram submetidas aos ensaios de compactação proctor normal, caracterização física e mineralógica, além dos ensaios de retenção de água e porosimetria de mercúrio. Todos eles foram realizados segundo técnicas e rotinas que permitiram a sua repetitividade.

O programa experimental de caracterização física contemplou os ensaios de teor de umidade natural, massa específica dos grãos, limites de Atterberg, densidade *in situ* e granulometria. Por sua vez, o programa de caracterização mineralógica abrangeu os ensaios de teor de matéria orgânica, análise em lupa binocular, difração de raios-x (DRX) e teor de carbono orgânico. Os ensaios hidráulicos se restringiram ao ensaio de curva de retenção de água e porosimetria de mercúrio. A seguir são descritas as técnicas e rotinas para a realização dos ensaios supracitados das amostras.

#### **3.3.1. Caracterização Física**

A caracterização física foi realizada no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente (LGMA) da PUC-Rio, utilizando amostras deformadas. Os procedimentos para realização destes ensaios seguiram as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), dos quais se destacam a NBR 6457/1986, NBR 7181/1984, NBR 6508/1984, NBR 6459/1984 e NBR 7180/1984.

A metodologia empregada na realização dos ensaios de granulometria seguiu as recomendações das normas da NBR 7181/1984.

Para a determinação da densidade *in situ* de solos não arenosos foram retiradas amostras indeformadas. Foi realizada uma avaliação em campo

utilizando anéis de alumínio, em triplicata. Sabendo o diâmetro interno dos anéis e o peso de cada amostra, tem-se a densidade de campo do material. A perda de umidade no trajeto campo-laboratório foi minimizada com o embrulho em papel filme e alumínio, sendo também envolvidas por dois sacos plásticos. As amostras foram pesadas imediatamente após retorno ao LGMA.

Uma vez que não é possível obter amostra indeformada para areias, a determinação da densidade de campo foi feita simulando o volume *in situ*. Para tal, foi estirada uma lona impermeável no local de retirada da amostra amolgada e, em seguida, foi despejado litros de água de forma a preencher o buraco. Conhecendo o volume despejado, o peso específico da água a 25°C e o peso do solo coletado, foi determinada a densidade.

Os limites de Atterberg foram obtidos a partir da execução dos ensaios especificados nas normas NBR 6459/1984 e 7180/1984. Com estes dados foram calculados o índice de plasticidade, dado pela diferença de ambos os limites, e a atividade dos materiais segundo a proposta de Skempton, conforme a equação abaixo:

$$I_a = \frac{IP}{\% < 0,02mm}$$

Em posse dos resultados obtidos do teor de umidade e densidade *in situ*, e após determinar a densidade dos grãos, seguindo a norma NBR 6508/1984, as outras propriedades índice correntemente empregadas na mecânica dos solos foram calculadas. A partir dos resultados obtidos foi possível classificar o solo de acordo com o sistema unificado de solo (SUCS). Os resultados da caracterização física dos solos amostrados serão apresentados no tópico 4.1.

### **3.3.2. Ensaio de compactação**

A compactação é uma técnica que permite melhorar as propriedades de um solo para propósitos de engenharia. Quando se compacta um material, ocorre a diminuição de vazios com a expulsão do ar e um aumento na densidade, o que conseqüentemente, aumenta o contato entre os grãos, aumentando a resistência ao cisalhamento e reduzindo a compressibilidade e permeabilidade do mesmo.

O equipamento básico consiste de um soquete de 2,5 kg, um molde cilindro metálico com diâmetro de 10 cm e altura de 12,73 cm ou molde metálico com diâmetro de 15 cm e altura de 17,8 cm (H da base 6,45 cm), e um anel complementar metálico. A altura de queda do soquete corresponde a 0,305 metros. São necessários alguns acessórios como régua de aço biselada, espátula de lâmina flexível, um extrator de amostra, entre outros. O procedimento do ensaio seguiu a norma NBR 6457/86.

A energia de compactação por unidade de volume utilizada no ensaio de Proctor normal pode ser determinada através da seguinte equação:

$$E = \frac{\left( \frac{N^{\circ} \text{ golpes}}{\text{por camada}} \right) \times \left( \frac{N^{\circ}}{\text{camadas}} \right) \times (\text{peso soquete}) \times (\text{altura queda})}{\text{Volume do molde}}$$

### 3.3.3. Caracterização Química-Mineralógica

A micromorfologia é um estudo importante para compreender a gênese do solo e avaliar as práticas agrícolas. A descrição das características do solo, de seus constituintes e estruturas como os tipos de poros, análise granulométrica e vestígios de atividade biológica são alguns dos parâmetros utilizados neste estudo.

A caracterização mineralógica das amostras foi realizada através de ensaios de difração por raios-X (DRX), da análise térmica diferencial (DTA), análise da fração grosseira pela lupa binocular, teor de matéria orgânica e teor de carbono orgânico.

O ensaio de queima de matéria orgânica foi determinado também no LGMA, baseando-se na norma NBR 13600/96. O ensaio consiste em secar o material por 24 horas na estufa de 105-110 °C, para posteriormente ser colocado na mufla a uma temperatura de 440°C por um período mínimo de 4 horas, até a obtenção da constância de massa. O teor de matéria orgânica é calculado pela diferença entre a massa do solo seco a 105°C e a massa após queima de 440°C, dividida pela massa do solo seco a 105°C. Para chegar a termos percentuais, foi multiplicado o resultado por 100.

O ensaio carbono orgânico foi realizado no Laboratório de Água, Solos e Plantas (LASP) da Embrapa Solos. Este ensaio tem como princípio a oxidação da

matéria orgânica via úmida com dicromato de potássio em meio sulfúrico, empregando-se como fonte de energia o calor desprendido do ácido sulfúrico e/ou aquecimento. O dicromato de potássio não consumido nesta queima é titulado com solução de sulfato ferroso amoniacal e determinado o teor de carbono orgânico. O teor de matéria orgânica é determinado através da multiplicação do valor de teor orgânico por um fator de 1,724 (EMBRAPA, 1997). Para a execução do ensaio, foram separados 20 gramas de cada solo passante na peneira #80, após secar ao ar.

As análises de DRX foram realizadas pelo método do pó em amostra total dos solos, sendo executadas no Laboratório de Difração de Raios-X da PUC-Rio, utilizando o equipamento D8-Discovery da marca Bruker com detector LynxEye. Ele foi operado na condição denominada Bragg-Brentano, com os ângulos Theta-2. Foram utilizados para o ensaio: Theta acoplados, tubo de cobre, filtro de Níquel, abertura de divergência de 0,6 mm, tensão de aceleração de 40 kV, corrente de 40 mA e varredura de até 70 graus de 2theta.

As análises das frações grosserias (areia e pedregulho) foram realizadas na lupa binocular no LGMA da PUC-Rio.

#### **3.3.4. Ensaio Hidráulicos**

A distribuição dos tamanhos de partículas sólidas confere porosidade e o arranjo de partículas características que, por sua vez, determinarão as propriedades hídricas, como a condutividade hidráulica e a relação entre a umidade ( $\Theta$ ) e o potencial matricial, ou seja, a curva característica da água no solo (Reichardt & Timm, 2012). As propriedades hídricas afetam os processos de absorção de nutrientes e de contaminantes.

Para a obtenção da curva característica foi utilizada a técnica do papel filtro, no LGMA. Este método se baseia na propriedade de meios porosos de absorver ou perder água ao entrarem em equilíbrio de pressão, em ambiente fechado. O ponto de equilíbrio é atingido quando o fluxo de fluido ou vapor cessa, sendo os valores de umidade do solo e do papel filtro diferentes para esse ponto, porém com a mesma sucção (Lopes, 2006). A curva de retenção de umidade é a expressão

gráfica da relação entre o teor de umidade (volumétrico) ou grau de saturação do solo e a sucção, que pode ser expressa como sucção mátrica ou total.

Nos ensaios realizados pelo método do papel filtro, inicialmente foram obtidas as dimensões dos anéis moldadores de aço ou alumínio. Um anel foi moldado para cada ponto da curva sendo confeccionados 10 anéis. Os corpos de prova foram umedecidos ou secados para obter o teor de umidade desejado. O umedecimento foi realizado por pesagem e a secagem, ao ar. Os corpos de prova foram embrulhados em papel filme e papel alumínio, e armazenados dentro de uma caixa de isopor fechada. Após equalização da umidade, os papéis filtro foram colocados em contato com o topo e a base de cada corpo de prova. O papel filtro empregado foi o Whatman número 42. Os anéis foram embrulhados, com papel filme e papel alumínio, e armazenados em uma caixa de isopor fechada, permanecendo assim por um período de 7 a 10 dias para que houvesse a equalização das sucções.

Passado esse tempo, os embrulhos foram abertos um a um e cada papel foi pesado em uma balança de precisão de 0,0001 grama em intervalos de 10 segundos durante o primeiro minuto. Após pesagem, os papéis foram secos em estufa com temperatura entre 105 a 110°C por no mínimo 2 horas, e então os papéis secos foram pesados novamente seguindo o mesmo intervalo de tempo descrito para a pesagem dos papéis úmidos. Os dados obtidos foram utilizados para montar o gráfico de variação do peso do papel versus (VS) a raiz do tempo, e obteve-se o valor da massa inicial do papel filtro através da interpolação dos dados para o tempo zero. Os pontos muito afastados da reta de ajuste, considerando o fator de correlação menor do que 0,96 foram desconsiderados da curva final.

Os ensaios de porosimetria por injeção de mercúrio foram executados no Laboratório da Fundação de Apoio à Física e à Química da Universidade de São Carlos, tendo sido utilizado o porosímetro do modelo *Micrometrics PoreSizer 9320*, com capacidade de investigação de poros com diâmetro de 0,0017mm a uma pressão de 1,7MPa, até diâmetros de 60Å, correspondente a uma pressão de 212MPa. A partir deste ensaio é possível determinar o tamanho e a distribuição dos poros no solo. Estas informações obtidas são intimamente relacionadas ao comportamento hidráulico do solo, uma vez que, a partir da distribuição dos poros é possível determinar o tipo de comportamento das curvas de retenção de

umidade, podendo fazer ajustes unimodais ou bimodais para estas (de Oliveira, 2013).

### **3.4. Desenvolvimento e validação do método para análise do 2,4-D**

Diversas técnicas analíticas são disponíveis para análises de agrotóxicos em matrizes ambientais. A técnica cromatográfica é comumente utilizada na identificação e quantificação e, dependendo da estrutura química do composto e da natureza da matriz, pode-se optar pela cromatografia gasosa ou pela cromatografia líquida. Outra opção seria a cromatografia com fluido supercrítico, porém esta ainda não desenvolveu toda sua potencialidade devido as pressões superiores às aquelas com as quais os cromatografistas estão mais habituados a trabalhar (Lanças, 2009).

A eficiência da análise de amostras de contaminantes orgânicos a partir da utilização da separação cromatográfica associada a um detector depende da calibração do instrumento e de uma série de operações que devem ser realizadas antes da própria análise, dentre elas, a coleta de amostras em campo, o armazenamento das amostras, o pré-tratamento das mesmas, as técnicas de extração, o *clean-up* e a pré-concentração dos analitos de estudo. Cada operação possui uma certa imprecisão que pode ser introduzida no procedimento analítico. Na escolha da técnica analítica, deve-se levar em conta o equipamento disponível, a natureza do composto a ser analisado e a complexidade da matriz de onde se deseja extrair o agrotóxico (Simões, 2003).

No caso de compostos fenoxiacéticos, usualmente é escolhido o HPLC, visto que analisa diretamente os contaminantes orgânicos sem a necessidade da derivatização (Moret *et al*, 2005; Voos *et al*, 1994; Kashyap *et al*, 2005). Porém, a análise do extrato de solo através do HPLC com detecção UV se mostra sensível as substância húmicas e fúlvicas, o que ocasiona uma grande alteração na linha base. Este problema pode ser resolvido caso seja realizado o *clean up* das amostras de solo previamente à injeção destas no cromatógrafo (Moret *et al*, 2005). Contudo, a necessidade de *clean up* do extrato será avaliada de acordo com o cromatograma.

Com relação a este trabalho, os procedimentos de preparação da solução padrão, teste de recuperação, extração e quantificação do 2,4-D foram realizadas no Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais do Departamento de Química da PUC-Rio. O padrão, reagentes e equipamentos utilizados foram descritos no Anexo 1. Nos experimentos de campo, os resíduos voláteis foram captados através de cartuchos de XAD-2 (sorvente para coleta de materiais gasoso e aerosol) . Também foram anexadas espumas de poliuretano nas amostras para indicar a perda do herbicida por ação de ventos laterais.

As amostras de solos foram enviadas ao laboratório da Bioagri Ambiental Ltda para análise do parâmetro 2,4-D. O método de análise foi o proposto pelo EPA, Method 8270C e o equipamento utilizado foi o cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa (GC-MS). Os resultados destas análises foram apresentadas no Anexo 2.

#### **3.4.1. Soluções padrões do 2,4-D**

Foram preparadas as soluções padrão mãe de  $5000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a partir da dissolução do produto em metanol. Através da diluição das soluções em metanol, as soluções de trabalho foram obtidas, que variaram de 0,1 a  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Todas as soluções foram armazenadas no freezer. Para realizar a curva de calibração foram injetadas no cromatógrafo as soluções de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 10,0; 20,0 e  $30,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e, na Figura 22, pode-se observar o sinal analítico destas concentrações nas colorações preta, rosa, azul, vinho, verde escuro, azul e verde claro, respectivamente.



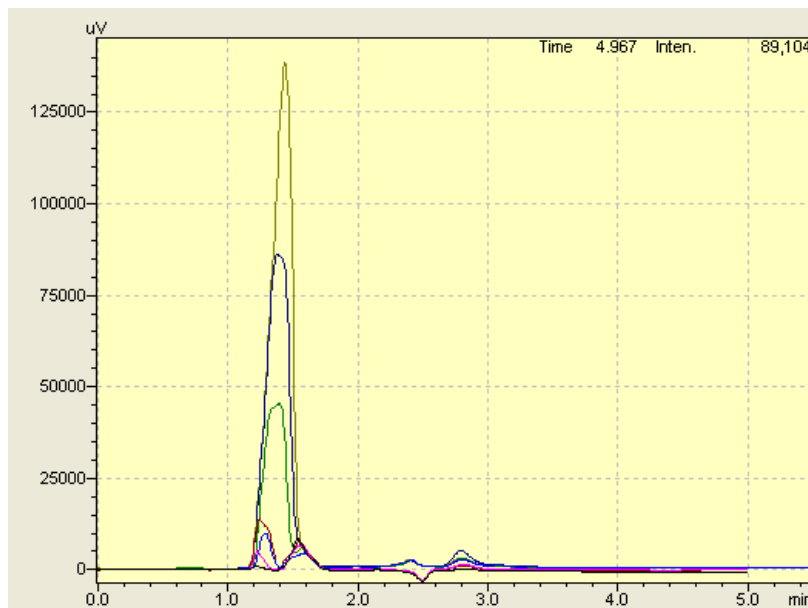


Figura 22 - Cromatograma das soluções padrão do 2,4-D em concentrações de 0,1 a 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para formar a curva de calibração do dia 10/11/2014.

### 3.4.2. Testes de eficiência de adsorção e desorção do XAD-2

O tubo suporte contendo a resina XAD-2 em quantidade de 140 mg x 270 mg foi o material adotado, conforme recomendado pela norma NIOSH para identificação e quantificação do 2,4-D. É recomendado pela norma NIOSH a realização de testes de contaminação do cartucho com concentrações conhecidas de agrotóxicos, como é o procedimento usual em qualquer teste de recuperação e eficiência do método.

A contaminação da resina nos cartuchos se deu através da adição de uma concentração conhecida do agrotóxico em 3 replicatas, além do branco feito em duplicata para cada teste. Os tubos foram deixados em repouso por aproximadamente 4 horas para que seu conteúdo fosse evaporado. A resina seca foi trocada de tubo, pois parte do agrotóxico poderia estar aderido na parede do cartucho e, assim, teria-se uma superestimativa da quantidade de 2,4-D adsorvido na resina, e posteriormente foi feito o procedimento de extração. Na impossibilidade em reproduzir o método exposto pela norma NIOSH, foram encontradas alternativas na literatura, como as propostas por Scheyer *et al* (2007) e Dos Santos *et al* (2011).

Três procedimentos de extração do herbicida nas amostras de resina foram testados. Dois expostos por Dos Santos *et al* (2011) e o terceiro método proposto pelo Amarante Jr *et al* (2003) e Queiroz (2007). Assim como os autores da primeira metodologia, foram testadas duas misturas de solventes: o n-hexano:diclorometano (1:1, v/v) e n-hexano:acetato de etila (7:3, v/v), submetendo as amostras em três ciclos de 15 minutos no ultrassom. O procedimento que obteve os melhores resultados está demonstrado na Figura 23.

A metodologia consultada para a análise cromatográfica do 2,4-D foi a descrita pela NIOSH, nº 5602, de 1998. Entretanto, essa metodologia prevê a utilização do detector de captura de elétron acoplado ao cromatógrafo gasoso. Como o equipamento proposto não estava disponível no Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais, foi utilizada a cromatografia líquida junto ao detector UV/VIS.

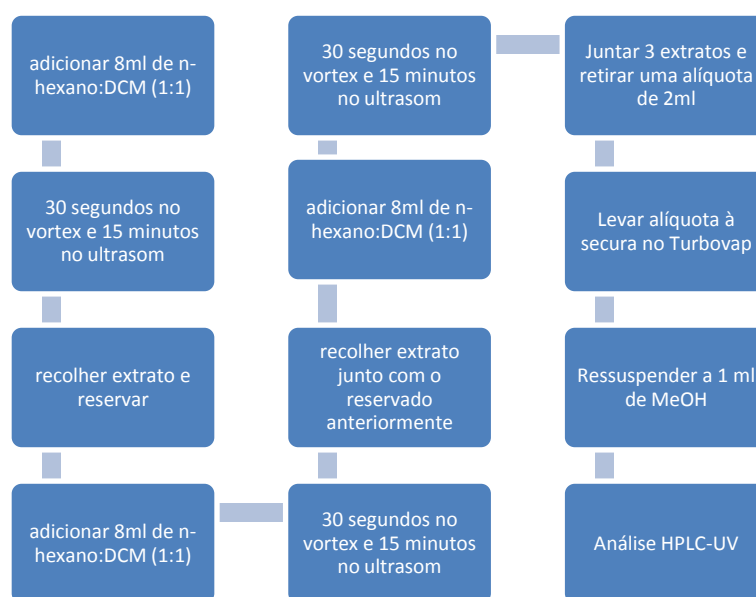


Figura 23 - Método de extração do 2,4-D das amostras em XAD-2 (Adaptado de: Dos Santos *et al*, 2011)

Após realização de testes para determinar a melhor resolução dos cromatogramas, ficaram estabelecidas as condições operacionais para identificação e posterior quantificação do herbicida. Estas condições são descritas na tabela abaixo.

Tabela 3.2 - Condições cromatográficas otimizadas

<i>Parâmetro</i>	<i>Condição estabelecida</i>
Fase móvel	MeOH:H <sub>2</sub> O (75:25)
Fluxo	1 ml.min <sup>-1</sup>
Pressão na coluna	10 Mpa
Modo de injeção	Isocrática
Volume de injeção	20 µl
Detector	UV, 230nm

### 3.4.3.

#### Validação analítica

Foram realizados testes de repetitividade, reprodutibilidade, recuperação, linearidade, limite de detecção do equipamento e do método para avaliação da viabilidade das modificações feitas baseadas nas metodologias encontradas na literatura. A norma NIOSH cita que a estabilidade do composto após cinquenta dias à 4 °C possui uma recuperação média de 91% no primeiro dia, atingindo uma recuperação de 101% ao chegar ao quinquagésimo dia. As amostras foram armazenadas no freezer à -5 °C.

Por definição do VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia), a repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sobre as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade. O teste para a determinação da repetitividade do método e do equipamento consiste em injetar uma determinada solução padrão do 2,4-D dez vezes consecutivas no cromatógrafo para determinar a média da concentração obtida, o desvio padrão e exatidão do cromatógrafo. Foram feitos dois testes, um com solução de 2,2 µg.ml<sup>-1</sup> e outro com solução de 0,1 µg.ml<sup>-1</sup>. O desvio padrão ( $s$ ), o valor médio ( $\bar{x}$ ), exatidão e o coeficiente de variação ( $CV$ ) foram calculados segundo as equações abaixo, onde  $N$  é o número total de medidas,  $x_i$  cada uma das medidas individuais e  $x_v$  um valor de referência considerado verdadeiro (Ribeiro *et al*, 2008).

Foi verificado a necessidade de esperar um intervalo de poucos minutos entre as injeções para garantir a repetibilidade dos resultados, além de deixar a

coluna estabilizar por 1 hora sob fluxo constante da fase móvel (FM) antes de realizar a primeira injeção do dia.

$$s = \left[ \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{N - 1} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{N}$$

$$CV = \frac{100s}{\bar{x}}$$

$$Exatidão = \left( \frac{x_i}{x_v} \right) \times 100$$

O desvio padrão foi de 0,029, exatidão de 99,8%, e coeficiente de variação de 1,3% para concentração de 2,2  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ , que é um ponto intermediário da curva de calibração. Para a solução mais diluída da curva analítica, foi obtido um desvio padrão de 0,009, exatidão de 89,6% e coeficiente de variação de 9,6% (ver Tabela 3.3). Estes resultados foram apresentados na Tabela 3.3 e indicam a estabilidade do equipamento, garantindo a boa leitura do cromatógrafo.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser adicionadas com analito em pelo menos três diferentes concentrações, próximo do limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (INMETRO, 2003). Foi realizado o teste de extração com quatro concentrações distintas. Cada concentração foi feita em triplicata e cada amostra foi injetada duas vezes. A média do percentual de recuperação pode ser vista na Tabela 3.4. Os percentuais de recuperação variaram de 70,8 a 99,9%, atendendo ao intervalo aceitável de recuperação entre 70 e 120% (Ribani *et al*, 2004).

Tabela 3.3- Teste de repetibilidade do equipamento em dias distintos

<i>n</i>	<i>Solução A (µg.ml<sup>-1</sup>)</i>	<i>Solução B(µg.ml<sup>-1</sup>)</i>
1	2,200	0,100
2	2,244	0,111
3	2,193	0,089
4	2,218	0,087
5	2,206	0,084
6	2,201	0,084
7	2,202	0,090
8	2,193	0,080
9	2,204	0,087
10	2,164	0,089
11	2,136	0,095
Média	2,196	0,090
Desvio	0,029	0,009
CV (%)	1,3	9,6
Exatidão (%)	99,8	89,6

Tabela 3.4- Média da recuperação de quatro concentrações de 2,4-D

<i>Concentração 2,4-D (µg.ml<sup>-1</sup>)</i>	<i>Recuperação amostra 1 (%)</i>	<i>Recuperação amostra 2 (%)</i>	<i>Recuperação amostra 3 (%)</i>
1,0	73,8	71,7	70,8
8,0	75,8	77,6	76,7
20,0	88,7	99,9	96,7
30,0	92,2	92,0	96,9

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de trabalho. Uma vez realizada a identificação do agrotóxico, a sua qualificação depende da relação entre a resposta do detector para cada um dos compostos pesquisados e a sua concentração (INMETRO, 2003). Foram feitas três curvas de calibração em três dias diferentes, com 7 níveis de concentração, as

mesmas citadas no tópico 3.4.1, partindo de duas soluções mãe diferentes. Estas curvas foram apresentadas na Figura 24, Figura 25 e Figura 26.

A partir do ajuste linear para as curvas de calibração, foram obtidos  $R^2 > 0,99$ , o que configura um bom ajuste. Os coeficientes angulares e lineares apresentaram uma pequena variação sendo influenciada pela concentração de  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  em todas elas. Contudo, estes valores são considerados satisfatórios e, portanto, o método apresenta linearidade.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (Rosa, 2003). O LDM é determinado através da análise completa de uma matriz contendo o analito (INMETRO, 2003). Portanto, o limite de detecção do equipamento foi calculado utilizando o ponto mais baixo de concentração da curva de calibração de soluções-padrão e o limite de detecção do método, utilizando o desvio padrão de 5 replicatas do ponto mais baixo de concentração da contaminação do solo. O limite de quantificação ficou em  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , enquanto que o limite de detecção do método apresentou-se em  $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

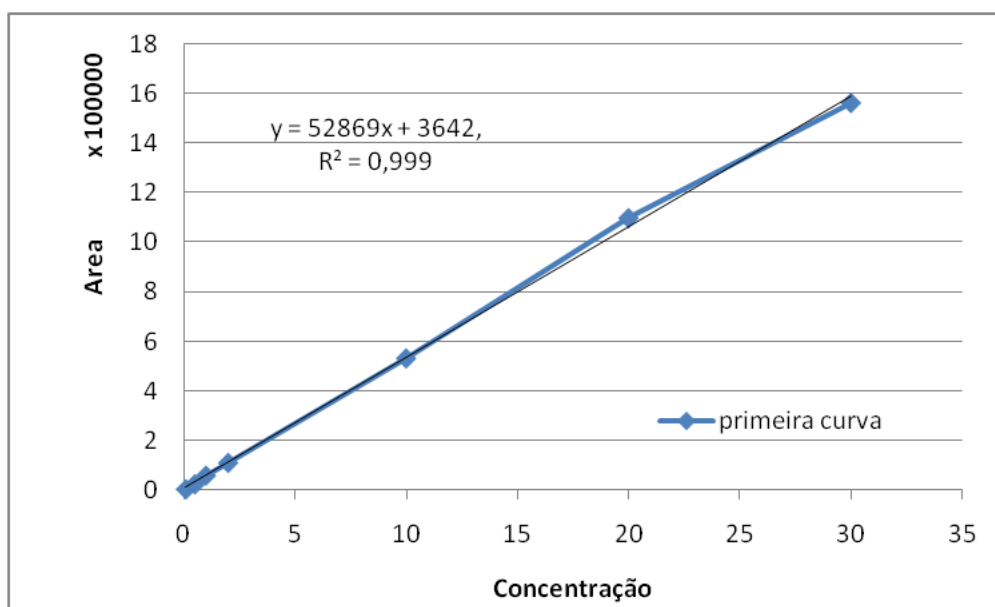


Figura 24 - Curva analítica do dia 10-11 ( $0,1$  a  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

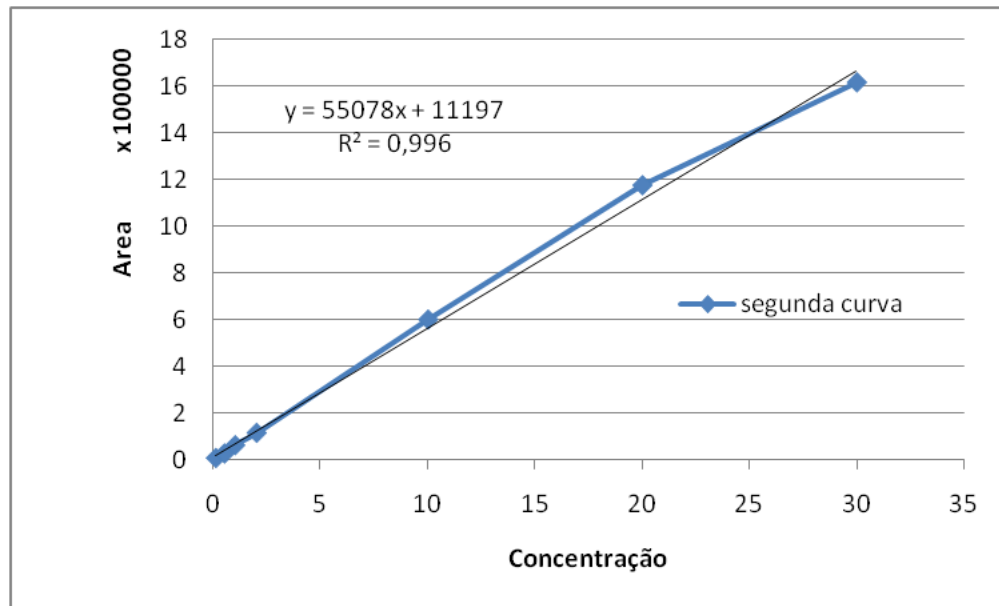


Figura 25 - Curva analítica do dia 11-11 (0,1 a 30  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )

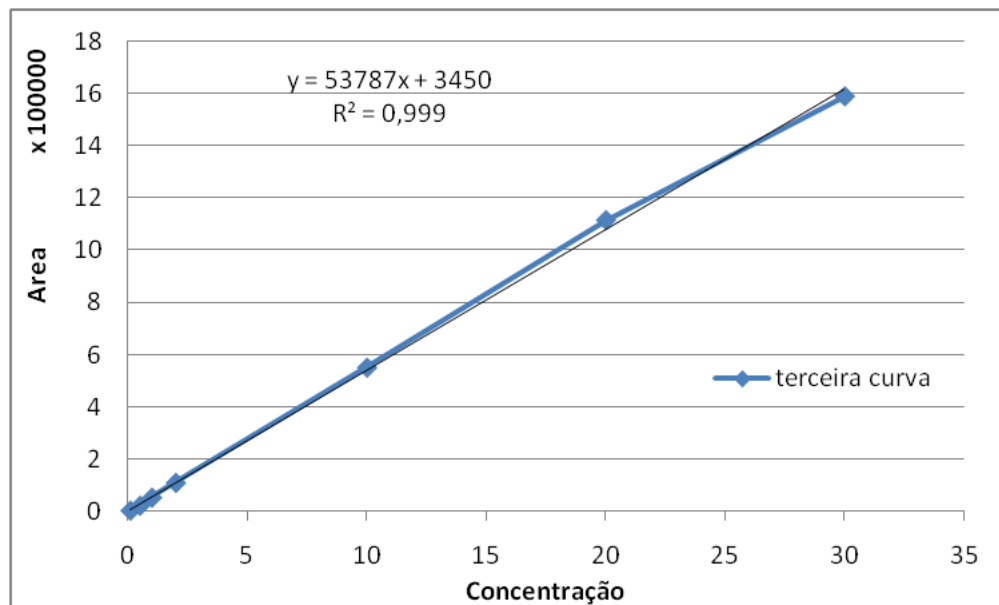


Figura 26 - Curva analítica do dia 12-11 (0,1 a 30  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )

### 3.5. Experimentos de volatilização

Devido ao caráter inovador do experimento em campo, não foram encontrados na literatura estudos ou procedimentos que direcionassem o desenho

experimental. Assim, foi desenvolvido um experimento de campo a fim de obter dados da volatilização do herbicida em solos.

Foi decidido que a aplicação do herbicida se daria em colunas individuais de solo posicionadas paralelamente a um determinado distanciamento entre elas. As colunas de PVC possuíam 15 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura, o que gerou um volume de  $5,3 \times 10^{-3}$  metros cúbicos a serem preenchidos de solo.

Considerando um solo de peso específico médio de  $1,75 \text{ g/cm}^3$ , seriam necessários cerca de 150 quilos de solo para preencher os dezesseis microcosmos, ou seja, 37,2 quilos de cada solo em quatro colunas. Foi determinado que outros vinte quilos de cada solo seriam destinados aos ensaios citados no tópico 3.3. Com base no cálculo supracitado, foram coletados cerca de sessenta quilos de cada material.

O fundo da coluna de PVC foi fechado com uma chapa de PVC perfurada para permitir o fluxo de água. Também foi utilizado papel filtro para forrar a base interna da coluna de forma a evitar migração de partículas finas do solo para o funil de 150 mm de diâmetro, anexado no fundo da coluna.

Para a realização do experimento foram moldadas 4 réplicas de cada solo, de acordo com as dimensões das colunas e, portanto, foram construídos 16 microcosmos. As amostras de solo foram previamente homogeneizadas e compactadas, simulando a densidade *in situ* de cada material. A umidade inicial do solo também foi manipulada. As amostras foram compactadas no teor ótimo de umidade, pois a idéia era repetir o experimento com teores diferentes de umidade.

A distribuição das amostras se deu em chapas de madeira, onde foram alocados três microcosmos posicionados em série (ver Figura 27). Foi escolhido este tipo de separação para facilitar o deslocamento do conjunto. Em Tinguá, os microcosmos foram posicionados no interior do cercado que rondava a estação meteorológica para evitar qualquer interferência do gado nos experimentos.

Os materiais mais utilizados para coleta de ar com o objetivo de identificar e quantificar agrotóxicos são a espuma de poliuretano (PUF) e a resina XAD-2. O XAD-2 é bastante efetivo para coleta de material gasoso e aerossol para uma grande variedade de compostos (Sanusi, 1997; Seiber, 1993; Coupe, 2000; Pletrzyk, 1981). A escolha por este material foi feita devido à sua alta eficiência nos testes de dessorção do herbicida. O total de amostras de XAD-2 analisadas foram 32, sendo um cartucho utilizado para cada coluna de solo em experimentos



que começavam no início da manhã ou no final da tarde. A espuma de poliuretano foi utilizada para estimar a perda lateral do herbicida por ser um material de baixo custo. Cada amostra de XAD-2 ou PUF teve duas leituras no cromatógrafo, totalizando 128 leituras.

Em Tinguá, os PUFs foram anexados aos microcosmos na direção Oeste, no sentido do vale, por ser a direção predominante dos ventos, segundo a utilização momentânea do anemômetro. O PUF foi colocado somente em uma direção para que não ocorresse total obstrução lateral das correntes dos ventos no entorno do microcosmo.



Figura 27 - Esquema e distribuição das colunas de PVC. Na figura (a), as colunas se encontram invertidas, com sua base mostrada para cima

Para absorver as partículas volatilizadas foi instalada uma coifa de vidro, posicionada a 2 cm da superfície do solo com diâmetro de 10 cm, em que foi afixada por uma mangueira de silicone a uma resina de XAD-2 conectada a uma bomba de vácuo regulada a um fluxo de ar de 2 L/min durante 24 horas (ver Figura 29). Segundo Prueger *et al* (2005), o fluxo máximo de volatilização se dá

entre 12 a 24 horas após aplicação do agrotóxico e o fluxo decresce uma ordem de grandeza após intervalo de 48 a 72 horas. Foi escolhido o funil de 10 cm para evitar o efeito estufa na superfície do microcosmo, o que modificaria as condições de campo.

A norma NIOSH estabelece um fluxo de 0,2 a 1 L.min<sup>-1</sup> para realizar a amostragem. Além disso, diversos trabalhos utilizaram o fluxo de 1 L.min<sup>-1</sup>, como Rosa (2003) e Thomas *et al* (2010). Porém, devido à eventual ocorrência de fortes ventos laterais, os fluxômetros foram ajustados a uma vazão de 2 L.min<sup>-1</sup> de ar na saída de cada cartucho do XAD, conforme adotado por Dos Santos *et al* (2011).

A aplicação do 2,4-D foi feita manualmente de acordo com a quantidade agrônômica maior, ou seja, a dose do produto de 7% e volume de calda de 250 L/ha (ver Tabela 3.5), indicada pelo MAPA, por gotejamento, através do uso de seringa Hamilton, distribuída homogeneamente na superfície de cada solo (*i.e.* 12,43 mg de 2,4-D na superfície do solo inserido no microcosmo). A opção de aplicação por spray foi descartada devido a perdas pela deriva, ocasionando incertezas na quantidade que chegaria ao solo.

Tabela 3.5 –Indicações registradas do produto comercial Tordon para controle de algumas pragas (MAPA, 2014).

<i>Cultura</i>	<i>Pragas</i>	<i>Dose do produto Tordon</i>	<i>Volume de calda terrestre (L/ha)</i>
Eucalipto	-	3 a 7%	200 a 250
Pastagens	Acacia plumosa	4%	200 a 400
Pastagens	Solanum lycoarpum	3 a 4%	200 a 400

Nas matrizes XAD-2 e PUF, a análise do 2,4-D foi realizada no HPLC-UV por ser um equipamento de análise altamente sensível que permite detectar baixas concentrações do analito na matriz.

Todos os materiais utilizados nos experimentos e nas análises das amostras de campo estão descritos no Anexo 1.

### 3.5.1. Volatilização no campo

Como um dos objetivos é comparar a diferença de volatilização do herbicida em função do horário de aplicação, a programação de campo foi dividida em duas campanhas de amostragem. Uma foi realizada no início da manhã, prática comum adotada pelos agricultores, e a outra, no final da tarde.

Devido à disponibilidade de poucas bombas de sucção, não foi possível montar o experimento completo de uma única vez. Assim, foram feitos dois experimentos de campo. O primeiro utilizando os solos 1 e 3 e o segundo com os solos 4 e 5. A Figura 28 apresenta o projeto simplificado do experimento de campo e a Figura 29 apresenta o registro fotográfico do experimento em Tinguá no dia 23/10/2014. Segue abaixo a Tabela 3.6 com a programação de campo.

Tabela 3.6 – Programação do experimento de volatilização em campo.

<i>Amostras</i>	<i>Data de coleta</i>	<i>Manhã</i>	<i>Final da tarde</i>
1	9/10, 10/10 e 11/10	4 colunas de solo	4 colunas de solo
3	9/10, 10/10 e 11/10	4 colunas de solo	4 colunas de solo
4	23/10, 24/10 e 25/10	4 colunas de solo	4 colunas de solo
5	23/10, 24/10 e 25/10	4 colunas de solo	4 colunas de solo

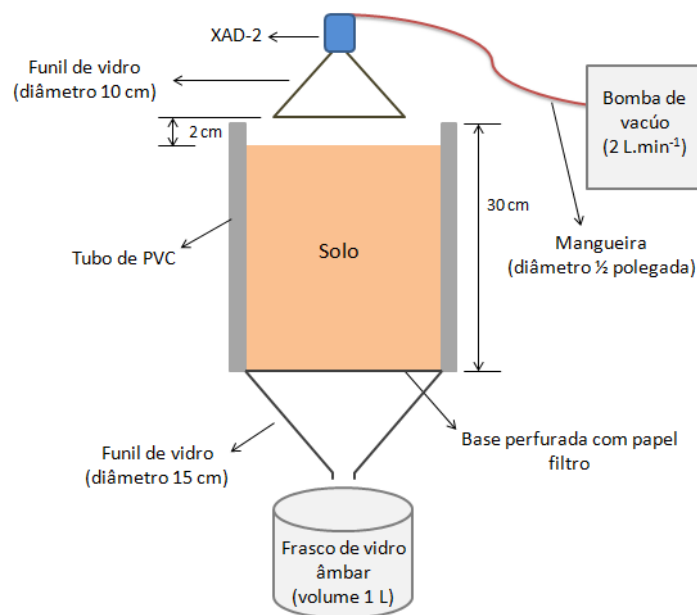


Figura 28 - Esquema do microcosmo utilizado no experimento em Tinguá



Figura 29 - Experimento em Tinguá no dia 23/10/2014

As “amostras controle” (amostras de solo sem a aplicação do herbicida) foram posicionadas a uma distância de aproximadamente 100 metros das demais para minimizar qualquer tipo de contaminação de 2,4-D pelo ar. A Figura 30 apresenta o local das amostras durante os experimentos.

A importância de incluir as “amostras controle” foi para comparar a quantificação do 2,4-D no seu tempo de retenção com as demais amostras. Geralmente, os cromatogramas das amostras de campo apresentam diversos picos que podem aparecer no mesmo tempo de retenção do herbicida, superestimando a sua quantificação. Caso isto aconteça, será necessário realizar uma correção na quantificação do 2,4-D.



Figura 30 – Locais das amostras nos experimentos em Tinguá.

### 3.5.2. Volatilização em sistema fechado

No experimento anterior, as recuperações do 2,4-D na matriz PUF foram maiores que na matriz XAD-2. Como houve uma fuga lateral do herbicida por ação dos ventos, foi realizado um teste adicional que suprimiu a interferência dos ventos para comparar os resultados de volatilização.

O local do novo experimento foi a laje do LGMA, onde foi utilizado amostra do solo de Duque de Caxias, em triplicata. O experimento consiste na mesma metodologia apresentada, porém não houve qualquer fuga lateral do 2,4-D, uma vez que a boca de cada funil foi encostada na superfície do solo (ver Figura 31), tornando o sistema fechado. A condição climática foi similar a do experimento final em Tinguá, sem ocorrência de chuvas ou de nuvens, e sol intenso. A máxima temperatura durante o experimento foi de 36,2°C e a mínima de 26,8°C, segundo dados da estação de Copacabana do INMET.



Figura 31 - Experimento em sistema fechado no terraço do LGMA

### 3.5.3. Determinação da perda de volatilização em sistema aberto

Como a recuperação do 2,4-D nas matrizes XAD-2 e PUF foi abaixo do esperado no primeiro experimento (*i.e.* do tópico 3.5.1), foi idealizado outro experimento que visou trabalhar com balanço de massa para estimar a perda total do 2,4-D pela volatilização.

O balanço de massa é composto pelas parcelas de volatilização, degradação do 2,4-D, parcela extraída do solo, parte não extraível do solo e perda lateral pelos ventos. As únicas variáveis que não são possíveis de quantificar são a parte não extraível do solo e a perda por ação dos ventos. Eliminando o solo do sistema, o balanço de massa se restringe apenas a volatilização, extração das vidrarias, e perda. Sabendo a concentração aplicada nas placas e analisando o 2,4-D nas vidrarias e no XAD-2, pode-se determinar a perda pelos ventos.

O procedimento adotado permaneceu o mesmo, porém a solução com 12,43 mg de 2,4-D foi dispersada em quatro placas de vidro de 150 mm de diâmetro para determinar a volatilização sem a interferência do solo e com sistema aberto

(ver Figura 32). O experimento foi realizado em Tinguá para reproduzir as mesmas condições dos experimentos realizados em Outubro de 2014, além de também ser dividido em duas partes. O herbicida foi aplicado em dois horários distintos, às 12 horas e às 17 horas da tarde. A condição climática foi similar a dos experimentos anteriores, sem ocorrência de chuvas ou de nuvens, e sol intenso.



Figura 32 - Experimento em sistema aberto em Tinguá

### 3.6. Biodisponibilidade através da abordagem ecotoxicológica

Além do experimento em Tinguá, também foi realizado outro estudo experimental para avaliação do efeito tóxico agudo da concentração de 2,4-D utilizada em campo sobre o oligoqueta edáfico da *Eisenia andrei* em cada tipo de solo estudado. Como os solos possuem características diferenciadas, estas deverão possibilitar o estudo da influência potencial das propriedades dos solos sobre a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a ecotoxicidade do herbicida (ver tópico 2.5). A avaliação da ecotoxicidade esteve fundamentada na comparação entre os níveis de sobrevivência e de biomassa obtidos com o solo puro (*i.e.*, sem adição de herbicida) e o solo contaminado.

A escolha pela *Eisenia andrei* deve-se pela padronização internacional dos ensaios ecotoxicológicos (Nunes, 2010). As minhocas possuem grande importância ecológica, devido à sua abundância em solos tropicais e temperados, ao seu papel na decomposição e na melhoria da textura dos solos, e na sua posição

na cadeia alimentar terrestre (Vijver *et al*, 2003). Além disso, a facilidade de seu cultivo em laboratório sob as mesmas condições, o relativo curto ciclo de vida, a praticidade em manipulá-las durante os experimentos e a possibilidade de serem expostas de diversas formas aos contaminantes, as minhocas são reconhecidas como organismos representativos para execução de testes toxicológicos.

Os organismos-teste foram cultivados no laboratório de microbiologia inserido no LGMA da PUC-Rio. Os animais foram criados em caixas plásticas contendo esterco de boi fresco à temperatura de  $21 \pm 2$  °C. Antes de introduzir os organismos, o pH do substrato foi ajustado até a faixa de 6-7 unidades por adição de carbonato de cálcio. O substrato era renovado e hidratado com água destilada a cada dois meses. Aveia moída era cozida em microondas e servida como alimento uma vez por semana. Os organismos utilizados em ensaio eram sexualmente maduros, da mesma geração, com clitelos totalmente desenvolvidos, e peso entre 300 e 700 mg.

O bioensaio agudo com *E. andrei* foi baseado nas recomendações de ASTM (2004) e ISO (1998). Para tanto, foram utilizados 10 oligoquetas adultos e 500g de solo para cada réplica (4), sendo a umidade ajustada para 40-60% da capacidade de retenção máxima de água, com a adição de água destilada. A constituição do solo artificial seguiu as recomendações de OECD (1984), ou seja, 70% de areia quartzosa, 20% de caulim e 10% de pó de fibra de coco, que funcionou como grupo controle. Antes de serem introduzidos no solo, os organismos foram deixados sobre papel filtro umedecido com água destilada em um recipiente de polietileno, durante 24 horas, para o purgamento do conteúdo intestinal. Após esta etapa, cada réplica (*i.e.*, os grupos de 10 minhocas) foi pesada. Durante os 14 dias de exposição em laboratório, os oligoquetas foram mantidos sem alimentação, à temperatura de 22 °C e com iluminação constante (ASMT, 2004). Ao final do ensaio, os sobreviventes foram submetidos novamente ao purgamento por 24 horas para serem posteriormente pesados. A avaliação da perda de biomassa dos animais (expressa em %) foi realizada com base no peso médio dos animais, antes e após a exposição.

A determinação da capacidade de retenção de água (CRA) ou *water holding capacity* (WHO) foi feita através do procedimento explicitado por Natal-da-Luz *et al* (2009). O objetivo do teste foi estimar a capacidade de campo de um solo através de um teste simples e rápido para o ajuste da umidade do solos a serem



testados com oligoquetas. Com o auxílio de uma fita cola, um papel filtro (número um) foi preso na base de uma coluna de PVC, de diâmetro interno de 2 cm e altura de 9 cm, que foi preenchida parcialmente por solo seco e destorroado (ver Figura 33).



Figura 33 - Execução do ensaio de CRA

O papel filtro foi saturado e tal conjunto foi pesado. Em seguida, a coluna foi colocada em um recipiente, onde foi adicionado um certo volume de água. Após observar a saturação da amostra pelo fenômeno da capilaridade, um novo volume de água foi adicionado ao recipiente para aumentar a diferença de pressão entre os níveis de água e forçar o aparecimento de uma lâmina d'água no interior da coluna. Após deixar o conjunto em repouso por 3 horas para garantir a saturação completa, a coluna foi retirada do recipiente e colocada em um escorredor por uma hora para drenagem do excesso de água por gravidade. A coluna com solo umedecido foi pesada e colocado na estufa a 105-100°C por 24 horas. Após tal procedimento, a coluna foi novamente pesada. A partir das

pesagens, pode-se determinar a CRA de um determinado solo. Os resultados foram apresentados no subtópico 4.7.

Além da capacidade de retenção de água, também foram realizadas análises do pH de cada solo com o intuito de determinar a alcalinidade ou acidez das amostras, além da disponibilidade potencial de sais (ver Tabela 4.19 no subtópico 4.7). A análise seguiu o proposto pela EMBRAPA (1997). Primeiramente foi adicionado 10 gramas de solo em 25 ml de KCl de 0,1M. Após agitação manual de um minuto com bastão de vidro, a solução ficou em repouso por uma hora. Finalmente, os dados foram obtidos por meio de eletrodo combinado imerso na solução.