

**DEGRADAÇÃO DO PARATION METÍLICO EM DIFERENTES MATRIZES
AQUOSAS: DADOS CINÉTICOS E RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA
TOXICIDADE E A FORMAÇÃO DO PARAOXON METÍLICO**

THIAGO MOREIRA DE REZENDE ARAÚJO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2015**

**DEGRADAÇÃO DO PARATION METÍLICO EM DIFERENTES MATRIZES
AQUOSAS: DADOS CINÉTICOS E RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA
TOXICIDADE E A FORMAÇÃO DO PARAOXON METÍLICO**

THIAGO MOREIRA DE REZENDE ARAÚJO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia – CCT, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Canela

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES
JULHO DE 2015**

**DEGRADAÇÃO DO PARATION METÁLICO EM DIFERENTES MATRIZES
AQUOSAS: DADOS CINÉTICOS E RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA
TOXICIDADE E A FORMAÇÃO DO PARAOXON METÁLICO**

THIAGO MOREIRA DE REZENDE ARAÚJO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia – CCT, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Canela

Aprovada em 20 de julho de 2015

Prof. Dr. Manildo Marcião de Oliveira – IFFluminense *campus* Cabo Frio

Prof. Dr. Paulo César Muniz de Lacerda Miranda – IQ/UNICAMP

Prof. Dr. Sérgio Luis Cardoso – LCQUI / CCT / UENF

Prof^a Dr^a Maria Cristina Canela – LCQUI / CCT / UENF
Orientadora

RESUMO

Título: Degradação do paration metílico em diferentes matrizes aquosas: dados cinéticos e relação entre o aumento da toxicidade e a formação do paraoxon metílico

Autor: Thiago Moreira de Rezende Araújo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Canela

Palavras Chaves: paration metílico, fotólise, paraoxon metílico, O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato, inibição da AChE

Os pesticidas organofosforados estão entre os mais utilizados atualmente, sendo o paration metílico (PME) um dos mais usados no Brasil e na região. Eles possuem como principal característica estrutural a presença de um fósforo pentavalente e como principal ação tóxica a inibição da AChE. Como eles vêm sendo detectados em águas naturais podendo se tornar um grande risco para o ambiente, se faz necessário estudar o comportamento dos mesmos nesses locais. Embora haja trabalhos que façam essa avaliação, a maioria realiza os testes em clima temperado, com águas naturais dessas regiões, apenas detectam os subprodutos formados e não fazem testes de toxicidade ao longo dos mesmos. Desta forma, esse trabalho estudou a degradação do PME em diferentes matrizes aquosas sob ação da radiação solar em ambiente de clima tropical, avaliando-se a toxicidade da solução frente ao teste de inibição da AChE e a formação do paraoxon metílico (POM). Porém, antes da realização dos testes de degradação sintetizou-se o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato (DHT) e comparou-se sua toxicidade com a do PME, do *p*-nitrofenol (PNF) e do POM. Almejava-se com esses procedimentos, entre outras finalidades, verificar se a proposta feita por Araujo (2006) da formação de um subproduto inédito da fotólise do PME estava correta. Os resultados obtidos nessa etapa mostraram que ela estava correta e que a ordem de toxicidade das substâncias era: PNF<DHT<PME<POM. Numa segunda etapa, foram realizados dois testes de degradação. O primeiro, foi feito utilizando-se soluções do PME (1,30 mg L⁻¹) em água ultrapura com e sem ácidos húmicos expostas ao sol envolvidas ou não com papel alumínio e, o segundo, feito de forma similar, porém utilizando-se soluções do PME em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e esterilizada. Os dados do experimento 1 mostraram que embora a fotólise indireta tenha contribuído significativamente para o desaparecimento do pesticida na solução, foi a fotólise direta o processo preponderante para levar à degradação do mesmo. Com relação à análise do POM e da toxicidade, os resultados mostraram que houve aumento da inibição da AChE das soluções em relação ao tempo inicial apenas quando as mesmas foram expostas diretamente a radiação solar. Também, somente nesses casos, o POM foi detectado e quantificado, chegando até concentrações de 15,1 e 20,3 µg L⁻¹, respectivamente, nos 24^o e 48^o dias de exposição para as soluções aquosas com e sem ácidos húmicos. Nas mesmas condições, a inibição da AChE chegou à valores iguais a 60 e 70 %. Esses resultados indicam que há relação entre a formação do POM e o aumento da toxicidade da solução. Com relação ao experimento 2, os resultados obtidos no mesmo reforçaram a relevância da radiação solar na degradação do paration metílico em solução aquosa e, também, indicaram que, nas condições avaliadas, processos de degradação abióticos foram mais importantes para degradar o pesticida do que os bióticos. Para esse experimento, novamente o POM só foi detectado nas amostras expostas diretamente a radiação solar. Porém, para as soluções preparadas a partir da água do rio “in natura” ele foi detectado em baixas concentrações, máximo de 1,87 µg L⁻¹ no 4^o dia de exposição, o que não levou a um acréscimo na inibição da AChE com relação ao tempo inicial.

ABSTRACT

Title: Methyl parathion degradation in different aqueous matrices: kinetic data and the relationship between increased toxicity and methyl paraoxon formation.

Author: Thiago Moreira de Rezende Araújo

Advisor: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Canela

Key words: methyl parathion, photolysis, paraoxon methyl, O,O-dimethyl O-*p*-hydroxyphenyl thiophosphate, AChE inhibition

Organophosphorus pesticides are widely used on the world and methyl parathion (PME) one of the most used in Brazil and the region. They have pentavalent phosphorus and the main toxic action is AChE inhibition. They has been detected in natural waters can become a risk to the environment. However, it is necessary to study their behavior in such places. There are studies that make this assessment, but they do the tests in temperate climate, with natural waters these regions, only detect byproducts formed and do not toxicity tests during the same. Thus, this work studied the PME degradation in different aqueous matrices under solar radiation in tropical environment, evaluating the solution toxicity by AChE inhibition test and the methyl paraoxon (POM). However, before degradation tests were synthesized O,O-dimethyl O-*p*-hydroxyphenyl thiophosphate (DHT) and compared your toxicity with PME, *p*-nitrophenol (PNF) and POM toxicity. These procedures were done, among other purposes, to verify whether the proposal made by Araújo (2006) about a novel byproduct formation by photolysis PME was correct. The results showed that it was correct and that the order of toxicity of the substances was: PNF<DHT<PME<POM. In a second time, there were two degradation tests. The first was do using PME solutions (1.30 mg L⁻¹) in ultrapure water with and without humic acids exposed to the sun involved or not with aluminum foil and, the second, was made using PME solutions of the Paraíba do Sul river with or without sterilized. In the first experiment, data showed that indirect photolysis has contributed significantly to the disappearance of the pesticide in solution, but the direct photolysis was the predominant process to lead to PME degradation. POM and toxicity analysis showed increased inhibition of AChE of the solutions to the initial time only when they were exposed directly to sunlight. Also, only in these cases, the POM was detected and quantified, arriving at concentrations of 15.1 and 20.3 ug L⁻¹, respectively, at 24th and 48th days of exposure to aqueous solutions with and without humic acids. Under the same conditions, AChE inhibition arrived at values equal to 60 to 70%. These results indicate that there is relationship between POM formation and the increase of the solution toxicity. The results obtained in the second experiment reinforced the importance of the solar radiation on the methyl parathion degradation in aqueous solution, and also indicated that, under these conditions, abiotic degradation processes were more important to degrade the pesticide than biotic. For this experiment, the POM was again only detected in samples exposed directly to solar radiation. However, for the solutions prepared from river water "in nature" it was only detected at low concentrations, up to 1.87 ug L⁻¹ on 4th exposure day, which did not lead increase in the AChE inhibition in relation to the initial time.

A dona Célia[†] e ao ArTHur.

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo aos meus pais, Sr. Carlos e DONA Maria, a base de tudo. Os melhores pais do mundo que agora se tornarão melhores avós.

Ao meu filho, ArTHur, que está por vir e que já está me ajudando, na barriga da mãe é claro, a escrever as referências bibliográficas. Estou muito ansioso e feliz pela sua chegada. Eu já te amo.

À minha filha de 7 anos, a Marina, que eu ganhei há 4. A moça com o sorriso mais bonito que eu conheço. Que hoje é a minha maior companhia. Aquela pessoa com a qual eu passo a maior parte do meu dia e que me faz sentir bem útil para alguém... Uma sensação única.

À Carol por ter tido a paciência suficiente para me esperar, por ser uma grande companheira, amiga, por estar tendo um filho comigo, por ter me ajudado muiiiito com as referências, por ter me dado uma filha já grande, por ter me apresentado a sua família linda e extremamente divertida. Enfim, obrigado por tudo. Eu te amo. ;)

Ao prof. Marco Tadeu Grassi que na minha banca de Mestrado me incentivou a ter mais atenção na parte de validação de métodos.

À minha orientadora, prof.^a Maria Cristina Canela, pelo apoio, incentivo, confiança e, principalmente, por ter insistido em trabalhar com o teste de inibição da AChE que se tornou parte importantíssima do presente trabalho.

Ao prof. Paulo Miranda pela formação sólida na graduação, por ter me ajudado muito com a síntese, que também é parte importantíssima do presente trabalho, por ter me recebido tão bem em sua casa e em seu laboratório. Obrigado também ao seu grupo de pesquisa, em especial ao seu aluno Caíque pela síntese com maior rendimento. Fica aqui o meu muito obrigado e um convite para que possamos compor um artigo em conjunto.

Ao prof. Manildo Marcião pela participação extremamente construtiva na banca de qualificação e por ter aceitado participar da banca da defesa da Tese mesmo passando por delicada situação familiar. Muito obrigado e boa sorte com o seu pai.

Ao prof. Sergio pelo seu jeito divertido, por ter participado da banca, mesmo tendo apenas uma semana para ler a Tese, e por ter me mostrado que as reações fotoquímicas ocorrem via cinética de 1ª ordem.

À prof.^a Roberta Ziolli por ter participado da banca de projeto e por ter cedido a AChE.

Ao grupo de pesquisa do prof. Arnoldo do CBB, por ter me deixado usar por tantas vezes o leitor de Elisa.

À prof.^a Cintia no IFFluminense por ter emprestado o laboratório por diversas oportunidades.

À prof.^a Raquel por ter emprestado um leitor de Elisa para fazermos as leituras no próprio laboratório 103.

Ao prof. Ivo e ao prof. Passoni pela participação extremamente construtiva na defesa do projeto.

A prof.^a Rosana e a Tania pela eficiência de sempre e por terem resolvido tão rápido a pendência da bolsa de 2005.

Ao professor Alexandre pela formação sólida na graduação e por ter se prontificado inicialmente a participar da banca da defesa.

A Gisela, secretária da pós, pelo excelente trabalho que realiza.

Aquelas pessoas que me ajudaram colocando a mão na massa direta ou indiretamente: Polyana, Camila, Damila, Michele, Monica, Samira, Luiz (Técnico do LCFIS), Maristela e a Carol mais uma vez.

Ao Leo e a Monique, padrinhos do ArTHur, pela grande amizade e por terem me ajudado tanto nessa fase final.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Química Ambiental (GPQA) – Camila, Thayana, Samira, Ruth, Polyana, Ronan, Anaína e aos amigos do laboratório 103 – Natália, Bianca, Samila, Clícia, Rafael, Luisa, Rafaela, Wagner, Érika, Larissa, Luana, Vagner e Isis, que sempre pegam no meu pé.

Aos grandes amigos pessoais: Boldo, Mariana, Simone, Rafael, Saulo, Angélica...

À minha família...tias, tios, primos.

Aos colegas do IFFluminense *campus* Campos-Centro pelo apoio.

Para finalizar, àquelas pessoas que eu não lembrei, mas que também são importantes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas do 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT) e do seu produto de degradação 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno (DDE).	24
Figura 2: Estruturas do tetraetilpirofosfato, do paration e do sarin.	26
Figura 3: Estruturas de alguns pesticidas organofosforados.	27
Figura 4: Mecanismo da quebra da acetilcolina em ácido acético e colina catalisada pela AChE (Extraído de Santos et al., 2007).	28
Figura 5: Inibição da AChE por um pesticida organofosforado (Extraído de Santos et al., 2007).	29
Figura 6: Rotas metabólicas de um pesticida organofosforado em mamíferos e insetos utilizando como exemplo o paration (Adaptado de Patrick, 2013).	31
Figura 7: Possíveis caminhos para a degradação do pesticida via fotólise indireta (Sens.=Sensibilizador; PX=Pesticida) (Adaptado de Burrows et al. (2002) e Mansour et al. (1999)).	36
Figura 8: Quebra da acetilticolina em acetato e tiocolina promovida pela AChE.	47
Figura 9: Reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB ²⁻) formando, entre outro produto, o ânion 5-tiol-2-nitrobenzoato (TNB ²⁻).	47
Figura 10: Esquema da rota utilizada para síntese do O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato.	53
Figura 11 A e B: Espectros de massas (70 eV) do O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato oriundo dos testes de degradação realizado por Araújo (2006) (A) e da rota sintética mostrada na Figura 10 (B).	55
Figura 12: Propostas estruturais de alguns fragmentos presentes no espectro de massas do O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato (Extraído de Araújo et al., 2013).	55
Figura 13: Proposta de conversão fotoquímica do paration metílico em O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato.	56
Figura 14: Placa de 96 poços logo após a realização do teste de inibição da AChE para o paration metílico e alguns dos seus subprodutos (PNF: p-nitrofenol; DHT: O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato; PME: paration metílico; POM: paraoxon metílico).	57
Figura 15: IC ₅₀ (3 horas) da AChE para o paration metílico e alguns dos seus subprodutos e a estrutura dos mesmos.	57
Figura 16: Algumas estruturas de ressonância do paration metílico e do O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato.	59
Figura 17: Aparato necessário para a realização da extração em fase sólida (A = manifold de extração; B = cartucho de extração; C = bomba à vácuo).	63

Figura 18: Cromatograma obtido, no modo SCAN, a partir de solução em acetato de etila de paraoxon metílico e paration metílico nas concentrações de 100 ppm.	65
Figura 19: Frascos de borossilicato, contendo as soluções com paration metílico, expostos ao sol imersos em água no tempo inicial do experimento 1.	69
Figura 20 A e B: Comparação de cromatogramas obtidos a partir dos brancos de diferentes matrizes extraídos com diferentes cartuchos (linha rosa = água ultrapura/Oasis HLB; linha azul = água ultrapura/SampliQ OPT; linha marrom = água ultrapura com ácidos húmicos/SampliQ OPT) com um cromatograma obtido a partir do ponto mais concentrado da curva analítica (linha preta) do paration metílico (A) e do paraoxon metílico (B).....	71
Figura 21: Copolímero (poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona) presente no cartucho Oasis HLB (500 mg/6 mL) da Waters. Adaptado de Waters (2003).	72
Figura 22: Estrutura do polímero presente no cartucho SampliQ OPT (60 mg/3 mL) da Agilent Technologies. Retirado de Agilent (2008).	73
Figura 23: Taxas de recuperação do paration metílico e do paraoxon metílico em água ultrapura (AP) e em solução contendo ácidos húmicos (AH) utilizando-se os dois cartuchos de SPE (SampliQ OPT e Oasis HLB) para a solução em água ultrapura e apenas o SampliQ OPT para a solução contendo ácidos húmicos.	74
Figura 24: Espectros UV-Vis obtidos no modo de absorbância para a água ultrapura com ácidos húmicos (AH), para a água ultrapura com e sem ácidos húmicos fortificadas com paration metílico (AH com PME e AP com PME, respectivamente) e no modo de transmitância para o frasco de borossilicato utilizado no presente trabalho.	79
Figura 25: Degradação do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos expostas diretamente (AHC e APC) ou protegidas com papel alumínio (AHE e APE) à radiação solar.	81
Figura 26: Concentração do paraoxon metílico, em $\mu\text{g L}^{-1}$, e porcentagem de inibição da AChE ocasionada pelas soluções ao longo do experimento 1.	85
Figura 27: Conversão do paration metílico em paraoxon metílico via o processo de fotólise direta.	87
Figura 28: Conversão do paration metílico em paraoxon metílico via o processo de fotólise indireta.	88
Figura 29: Frascos de borossilicato, contendo as soluções com paration metílico, expostos ao sol imersos em água no tempo inicial do experimento 2.	95
Figura 30: Placas que foram semeadas com água do rio “in natura” ou autoclavada e deixadas em estufa por 48 h a 37 °C.	97
Figura 31: Espectros UV-Vis obtidos, no modo de absorbância, para a água do rio “in natura” (RI) e autoclavada (RA), fortificadas ou não com paration metílico (PME), para a solução aquosa contendo ácido húmico utilizada no experimento 1 (AH) e, no modo de transmitância, para o frasco de borossilicato utilizado nos testes de degradação.	98

Figura 32 A e B: Comparação de cromatogramas obtidos a partir dos brancos de diferentes matrizes extraídos com o cartucho SampliQ OPT (linha rosa = água do rio “in natura” e linha azul = água do rio autoclavada) com um cromatograma obtido a partir do ponto mais concentrado da curva analítica (linha preta) do paration metílico (A) e do paraoxon metílico (B).....	99
Figura 33: Taxas de recuperação do paration metílico e do paraoxon metílico em água do rio “in natura” (RI) e autoclavada (RA) utilizando-se o cartucho SampliQ OPT para extração em fase sólida.	100
Figura 34: Degradação do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada expostas diretamente (RIC e RAC) ou protegidas com papel alumínio (RIE e RAE) à radiação solar.....	102
Figura 35: Concentração do paraoxon metílico, em $\mu\text{g L}^{-1}$, e porcentagem de inibição da AChE ocasionada pelas soluções ao longo do experimento 2.....	106
Figura 36: Retirada do cérebro de um rato saudável para extração da AChE.....	118
Figura 37: Mistura do cérebro de rato após ser triturada e centrifugada.	119
Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C do O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato.....	120
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H para o O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato.....	121
Figura 40: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.	123
Figura 41: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.	124
Figura 42: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.....	125
Figura 43: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.....	126

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Consumo de ingredientes ativos de pesticidas, considerando um total de 71 países, nos anos de 2006 e 2010.	31
Tabela 2: Venda de ingredientes ativos (em tonelada) de pesticidas no Brasil entre os anos de 2006 e 2013 e do pesticida organofosforado paration metílico.....	31
Tabela 3: Resumo dos resultados encontrados em trabalhos que avaliam a contaminação de corpos aquáticos por pesticidas.	33
Tabela 4: Diferentes condições avaliadas no trabalho Lartiges e Garrigues (1995) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do paration metílico (PME) nas mesmas.	39
Tabela 5: Diferentes condições estudadas por Sakellarides e colaboradores (2003).....	40
Tabela 6: Diferentes condições avaliadas no trabalho de Araújo (2006) e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) do paration metílico (PME) nas mesmas.	41
Tabela 7: Diferentes condições estudadas no trabalho Stegu e Druzina (2007) e os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) do paration metílico (PME) nas mesmas.....	42
Tabela 8: Soluções em acetona grau HPLC (Tedia) utilizadas nos testes para a determinação do IC_{50} (3 horas) da AChE.	51
Tabela 9: Dados dos espectros de RMN do O,O-dimetil O-p-hidroxifenil tiofosfato sintetizado.	54
Tabela 10: Parâmetros cromatográficos que foram utilizados para a realização das análises.	65
Tabela 11: Íons (fragmentos) selecionados para análise de cada substância e para a corrida de maneira geral, tempos de retenção (t_r) encontrados e o tempo total da corrida.	65
Tabela 12: Condições nas quais a degradação do paration metílico (PME) foi avaliada no experimento 1, siglas utilizadas e prováveis processos de degradação do pesticida em estudo nas mesmas.....	69
Tabela 13: Taxas de recuperação, determinadas por Castillo e colaboradores (1997), para o paration metílico (PME) e paraoxon metílico (POM) em água subterrânea fortificada com os mesmos na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando-se diferentes sorbentes para extração em fase sólida.	73
Tabela 14: Parâmetros das curvas analíticas do paration metílico (1,30; 1,00; 0,700; 0,400 e $0,0500 \text{ mg L}^{-1}$) e do paraoxon metílico (30,0; 15,0; 7,50; 3,75 e $0,0500 \mu\text{g L}^{-1}$) em água ultrapura e em solução contendo ácidos húmicos.....	75
Tabela 15: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise, em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos para determinação do paration metílico (PME) e do paraoxon metílico (POM) em água ultrapura com e sem ácidos húmicos.	76

Tabela 16: Médias da intensidade da radiação e das temperaturas máximas e mínimas do ambiente e do banho com suas respectivas estimativas do desvio padrão, entre parênteses, no período no qual o experimento 1 foi realizado.....	80
Tabela 17: Tempos de meia-vida presentes na literatura para a degradação do paration metílico em diversas matrizes aquosas deixadas no escuro em diferentes temperaturas....	81
Tabela 18: pH inicial das soluções utilizadas no experimento 1 e dados cinéticos determinados para a degradação do paration metílico nas diferentes condições testadas considerando-se um modelo cinético de 1ª ordem. (k = constante de velocidade e $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida)	82
Tabela 19: Constantes de velocidade (k) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) estimados para a degradação do paration metílico via diferentes processos. (k = constante de velocidade e $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida)	84
Tabela 20: Condições nas quais a degradação do paration metílico (PME) foi avaliada no experimento 2, siglas utilizadas e prováveis processos de degradação do pesticida em estudo nas mesmas.....	94
Tabela 21: Análises físico-químicas da água do rio “in natura” e autoclavada realizadas no presente estudo e alguns parâmetros presentes na resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) do Ministério do Meio Ambiente.....	97
Tabela 22: Parâmetros das curvas analíticas do paration metílico (1,30; 1,00; 0,700; 0,400 e 0,0500 mg L ⁻¹) e do paraoxon metílico (30,0; 15,0; 7,50; 3,75 e 0,500 µg L ⁻¹) em água do rio “in natura” e autoclavada.	101
Tabela 23: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise, em µg L ⁻¹ , obtidos para determinação do paration metílico (PME) e do paraoxon metílico (POM) em água ultrapura com e sem ácidos húmicos.....	101
Tabela 24: Médias da intensidade da radiação e das temperaturas máximas e mínimas do ambiente e do banho com as estimativas do desvio padrão, entre parênteses, no período no qual o experimento 2 foi realizado.	102
Tabela 25: pH inicial das soluções utilizadas no experimento 2 e dados cinéticos determinados para a degradação do paration metílico nas diferentes condições testadas considerando-se um modelo cinético de ordem zero (RAC e RIC) ou de 1ª ordem (RAE e RIE). (k = constante de velocidade e $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida)	103
Tabela 26: Resultados encontrados por Araujo e colaboradores (2007) para a degradação do paration metílico formulado (Folisuper 600 BR da Agripec) em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada.	104
Tabela 27: Porcentagens de inibição da AChE encontradas para as soluções do paration metílico e de alguns de seus subprodutos.	122

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Porcentagem de inibição.....	53
Equação 2: Intervalo de confiança da média	67
Equação 3: Limite de detecção (LD)	68
Equação 4: Limite de quantificação (LQ)	68

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AF	Ácidos fúlvicos
AH	Ácidos húmicos
AHC	Ácido húmico claro
AHE	Ácido húmico escuro
ANVISA/MS	Agência de Vigilância Sanitária Nacional do Ministério da Saúde
AP	Água ultrapura
APC	Água ultrapura claro
APE	Água ultrapura escuro
CG/EM	Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
COD	Carbono orgânico dissolvido
DDE	1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
DHT	O,O-dimetil O- <i>p</i> -hidroxifenil tiofosfato
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DTNB ²⁻	Íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
FAO	Organização de alimentos e agricultura das Nações Unidas.
GLU	Ácido glutâmico
HCB	hexaclorobenzeno
HIS	Histidina
IC ₅₀ (3horas)	Concentração na qual a inibição da enzima, após 3 horas de incubação, é igual a 50 %.
<i>k</i>	Constante de velocidade
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
PKC	Proteínas do tipo quinases
PME	Paration metílico
PNF	<i>p</i> -nitrofenol
POA	Processos oxidativos avançados
POM	Paraoxon metílico
PX	Pesticida
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
<i>r</i> ²	Coefficiente de correlação ao quadrado
RA	Água do Rio Autoclavada

RAC	Rio autoclavada claro
RAC	Rio autoclavada escuro
RI	Água do Rio “in natura”
RIC	Rio “in natura” claro
RIE	Rio “in natura” escuro
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies oxidativas de oxigênio
S	Coeficiente angular da curva analítica
s	Estimativa do desvio padrão do branco
SENS.	Sensibilizador
SER	Serina
SH	Substâncias húmicas
SIM	Monitoramento de íon seletivo
SPE	Extração em fase sólida
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TEEP	Tetraetilpirofosfato
TIC	Cromatograma de íons totais
TNB ²⁻	Ânion 5-tiol-2-nitrobenzoato
UTC	Tempo universal coordenado
UV-VIS	Radiação Ultravioleta–Visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	22
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Um breve histórico da utilização de pesticidas.....	23
1.2 Pesticidas organofosforados.....	25
1.2.1 Breve histórico	25
1.2.2 Estrutura química.....	27
1.2.3 Toxicidade.....	27
1.3 Utilização de pesticidas no Brasil e no mundo e contaminação de ambientes aquáticos naturais.....	31
1.4 Comportamento dos pesticidas em ambientes aquáticos naturais	34
1.4.1 Reações de hidrólise.....	34
1.4.2 Reações redox.....	35
1.5 Degradação de pesticidas organofosforados em ambientes aquáticos naturais sob ação da radiação solar	38
1.6 Utilização de testes de toxicidade ou de neutotoxicidade para acompanhar a degradação de pesticidas organofosforados em matrizes aquosas	44
2. OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos	48
CAPÍTULO 2	49
1. METODOLOGIA	50
1.1 Síntese e caracterização do O,O-dimetil O- <i>p</i> -hidroxifenil tiofosfato.....	50
1.2 Avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos frente ao teste de inibição da AChE.....	51
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
2.1 Síntese e caracterização do O,O-dimetil O- <i>p</i> -hidroxifenil tiofosfato.....	53
2.2 Avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos frente ao teste de inibição da AChE.....	56

CAPÍTULO 3	61
1. METODOLOGIA	62
1.1 Preparo da solução aquosa contendo ácidos húmicos.....	62
1.2 Método de análise utilizado para quantificar o paration metílico e o paraoxon metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos	63
1.3 Validação do método de análise	66
1.3.1 Determinação da seletividade, exatidão e precisão do método de análise.....	66
1.3.2 Linearidade do método de análise – curvas analíticas	67
1.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise.....	67
1.4 Degradação abiótica do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos – experimento 1	68
1.4.1 Preparo e exposição das soluções à radiação solar.....	68
1.4.2 Quantificação do paration metílico e do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 1.....	70
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
2.1 Validação do método de análise	71
2.1.1 Seletividade, exatidão e precisão do método de análise	71
2.1.2 Linearidade do método de análise – curvas analíticas	75
2.1.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise.....	76
2.2 Degradação do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos – experimento 1	77
2.2.1 Considerações iniciais sobre o teste de degradação e a exposição das soluções à radiação solar no experimento 1	77
2.2.2 Resultados cinéticos da degradação do paration metílico no experimento 1.....	81
2.2.3 Formação do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 1	84
 CAPÍTULO 4	 91
1. METODOLOGIA	92
1.1 Coleta e tratamento inicial da água do rio Paraíba do Sul.....	92
1.2 Análises físico-químicas realizadas na água do rio “in natura” e autoclavada	93
1.3 Validação do método de análise	93

1.4 Degradação biótica e abiótica do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada – experimento 2.....	94
1.4.1 Preparo e exposição das soluções à radiação solar.....	94
1.4.2 Quantificação do paration metílico e do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 2.....	95
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
2.1 Tratamento inicial da água do rio Paraíba do Sul e análises físico-químicas	96
2.2 Validação do método de análise	99
2.3 Degradação do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada – experimento 2	101
2.3.1 Exposição das soluções à radiação solar.....	101
2.3.2 Resultados da degradação do paration metílico no experimento 2	102
2.3.3 Formação do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 2.....	105
 CAPÍTULO 5	 108
1. CONCLUSÕES.....	109
2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	110
 CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 111
 ANEXO 1: Extração da AChE de cérebros de ratos.....	 118
ANEXO 2: Espectro de RMN de ¹³ C do O,O-dimetil O- <i>p</i> -hidroxifenil tiofosfato	120
ANEXO 3: Espectro de RMN de ¹ H do O,O-dimetil O- <i>p</i> -hidroxifenil tiofosfato.....	121
ANEXO 4: Porcentagens de inibição da AChE encontradas para as soluções do paration metílico e de alguns de seus subprodutos.	122
ANEXO 5: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.	123
ANEXO 6: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.....	124
ANEXO 7: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.....	125

ANEXO 8: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.....	1246
---	------

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Um breve histórico da utilização de pesticidas

O uso de compostos químicos visando o controle de pragas como insetos e a proteção das lavouras de alimentos já é prática comum há alguns séculos. Esses compostos são denominados de pesticidas, defensivos agrícolas, agrotóxicos, agroquímicos, dentre outros, e são substâncias que matam ou controlam um organismo indesejável (Baird e Cann, 2011; Eleršek e Filipič, 2011).

Os primeiros pesticidas utilizados eram compostos inorgânicos e organometálicos, tais como: dióxido de enxofre, fluoreto de sódio, compostos de arsênio e de mercúrio. Esses compostos possuíam elevada persistência no meio ambiente e alta toxicidade aos seres humanos e a outros mamíferos, principalmente devido às quantidades elevadas requeridas para torná-los pesticidas efetivos. Com o desenvolvimento dos produtos orgânicos sintéticos, principalmente entre as décadas de 40 e 50 do século XX, o uso desses compostos diminuiu e hoje eles praticamente não são utilizados (Baird e Cann, 2011).

De maneira geral, os pesticidas orgânicos são menos tóxicos que os compostos inorgânicos e podem ser utilizados em menores quantidades tendo o mesmo efeito sobre o organismo alvo. Os primeiros pesticidas orgânicos utilizados foram os organoclorados, ou seja, compostos orgânicos que contêm cloro e que não possuem outra característica estrutural marcante. Muitos deles foram amplamente utilizados durante a 2ª Guerra Mundial para controlar vetores de doenças. O DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano), Figura 1, por exemplo, foi usado para evitar surtos de tifo, malária, febre amarela e peste bubônica. Após a Guerra, o uso desses pesticidas nas lavouras de todo o mundo foi intensificado, principalmente devido à necessidade de expansão da produtividade agrícola nesse período e, ainda, pela grande quantidade de novos pesticidas organoclorados lançados no mercado pelas indústrias químicas no pós-guerra (Baird e Cann, 2011).

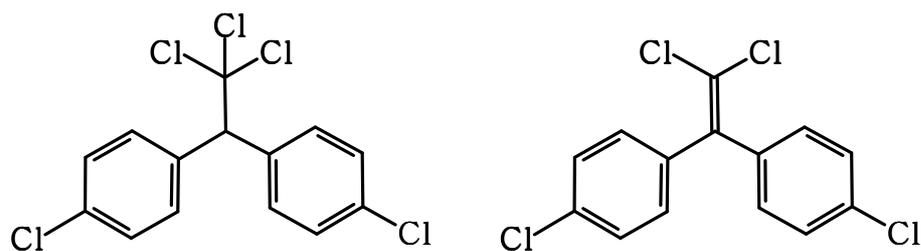


Figura 1: Estruturas do 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT) e do seu produto de degradação 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno (DDE).

Esse período marca uma mudança na maneira de produção no campo, visto que, até a década de 40 do século XX, a maioria dos agricultores administrava os problemas decorrentes do sistema produtivo mediante a rotação de culturas e o controle biológico de pragas. Sendo assim, se por um lado, essas substâncias aumentaram significativamente a produtividade agrícola, por outro, o produtor passou a ser dependente de insumos produzidos fora de seu circuito (Martins, 2000).

Os organoclorados foram utilizados nas lavouras durante vários anos e, diferentemente do esperado, verificou-se que grande parte desses compostos apresentava elevada estabilidade em relação à degradação ambiental, podendo persistir por até 30 anos no solo (Brasil, 1998; Baird e Cann, 2011). Devido a sua lenta degradação e alta lipofilicidade, esses compostos acumulam-se no tecido adiposo de animais, fenômeno chamado de bioconcentração, concentrando-se ao longo da cadeia alimentar, processo chamado de biomagnificação, gerando um grande impacto ambiental. Estudos mostraram que aves que se alimentavam de peixes que viviam na região dos Grandes Lagos, local onde houve durante muito tempo uso indiscriminado desses compostos, apresentavam concentração de organoclorados 8,3 milhões de vezes maior que a concentração na água. Muitos desses animais apresentavam algumas deformações graves de nascimento. Para agravar a situação, a metabolização e/ou degradação desses compostos no meio ambiente não significa necessariamente que eles estejam totalmente inócuos na natureza, visto que, muitas vezes, os seus produtos de degradação são mais tóxicos e mais persistentes que os compostos iniciais (Baird e Cann, 2011).

No caso do DDT, por exemplo, um de seus produtos de degradação, o 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno (DDE - Figura 1), é muito mais tóxico que o

pesticida original para diversas aves, concentra-se mais facilmente no tecido adiposo de animais e é mais persistente no ambiente (Baird e Cann, 2011).

Desse modo, o emprego dessas substâncias foi progressivamente restringido ou mesmo proibido. No Brasil, essa restrição iniciou-se a partir do ano de 1971 com a proibição da fabricação e da comercialização do DDT e do hexaclorobenzeno (HCB) para o controle de ectoparasitos em animais domésticos (D'Amato *et al.*, 2002). Porém, somente em 1985, através da Portaria nº 329/85, proibiu-se, em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados à agropecuária, sendo somente seu uso permitido em campanhas de saúde pública no combate de vetores de agentes etiológicos de moléstias (malária e leishmaniose), bem como no uso emergencial na agricultura, a critério do Ministério da Agricultura. Com o declínio na utilização dos pesticidas organoclorados, outras classes de compostos passaram a ser amplamente utilizadas no campo. Dentre elas, destaca-se a classe dos pesticidas organofosforados (Pehkonen e Zhang, 2002; Santos *et al.*, 2007).

1.2 Pesticidas organofosforados

1.2.1 Breve histórico

Os primeiros compostos organofosforados foram preparados por alquimistas ainda na Idade Média, porém, somente no início do século XIX, inicia-se um estudo sistemático na preparação dessas substâncias (Costa, 2006; Santos *et al.*, 2007).

A descoberta da ação tóxica e inseticida de alguns compostos de fósforo ocorreu em 1930 pelo químico alemão Gerhard Schrader e a mesma impulsionou a síntese de novos pesticidas organofosforados (Costa, 2006; Santos *et al.*, 2007; Patrick, 2013). Esse pesquisador tem ainda o crédito de ter sintetizado e avaliado a toxicidade, em 1944, do primeiro inseticida organofosforado que foi comercializado (tetraetilpirofosfato (TEEP) – Figura 2) e, também, de um dos mais conhecidos até hoje, o paration etílico ou apenas paration (Figura 2) (Costa, 2006; Santos *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012; Patrick, 2013). A síntese desse último composto, embora de elevada toxicidade e com sua utilização atualmente proibida em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (Brasil, 1992), marca um grande avanço no preparo de pesticidas organofosforados e no conhecimento científico na relação

estrutura/atividade inseticida. Sua descoberta fez com que se avançasse nessas áreas e, além disso, vários pesticidas organofosforados utilizados atualmente possuem estrutura similar a desse composto (Costa, 2006; Santos *et al.*, 2007).

Embora, para a utilização dos compostos organofosforados como inseticidas se buscasse substâncias com alta toxicidade apenas para os insetos (Santos *et al.*, 2007), em um momento da nossa história, buscou-se também a síntese de organofosforados de alta toxicidade para os seres humanos (Silva *et al.* 2012). Infelizmente, vários compostos organofosforados foram utilizados como agentes bélicos durante a segunda guerra mundial (Silva *et al.* 2012). A estrutura do sarin, um dos gases de guerra mais conhecidos, é mostrado na Figura 2. Como será visto com detalhes adiante, a principal ação tóxica desses agentes e, também, dos pesticidas organofosforados é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE).

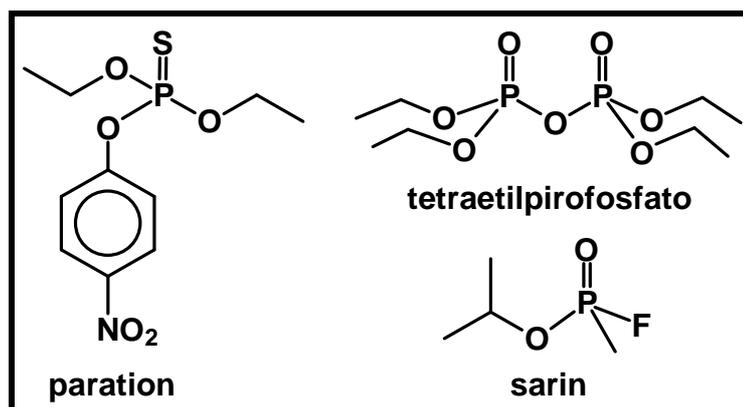


Figura 2: Estruturas do tetraetilpirofosfato, do paration e do sarin.

Além dos citados anteriormente, vários outros inseticidas organofosforados foram sintetizados e introduzidos no mercado principalmente entre as décadas de 60 e 80 do século XX e, mesmo com o surgimento de outras classes de pesticidas (ex.: carbamatos, piretróides e triazinas) e de novas metodologias de controle de pragas, 40 % do mercado mundial de agrotóxicos em 1999 era representado por organofosforados (Santos *et al.*, 2007). Nesse sentido, vários autores (Costa, 2006; Aydin *et al.*, 2011; Eleršek e Filipič, 2011) citam que os compostos organofosforados estão entre os pesticidas mais utilizados no mundo nos últimos anos.

1.2.2 Estrutura química

Estruturalmente, todas as moléculas de pesticidas organofosforados podem ser consideradas como derivadas do ácido fosfórico, $O=P(OH)_3$, e consistem de um átomo de fósforo central pentavalente no qual estão, geralmente, conectados (Baird e Cann, 2011):

- um átomo de oxigênio ou enxofre ligado ao átomo de fósforo por uma ligação dupla;
- um ou dois grupos metoxi ($-OCH_3$), etoxi ($-OCH_2CH_3$), propoxi ($-OCH_2CH_2CH_3$) ou ainda seus análogos sulfurados ligados ao átomo de fósforo por uma ligação simples;
- um grupo amina ou grupo $-OR$ ou $-SR$ mais longo e mais complexo, ligado ao átomo de fósforo mediante uma ligação simples.

Na Figura 3, seguem alguns exemplos dessa classe de pesticidas.

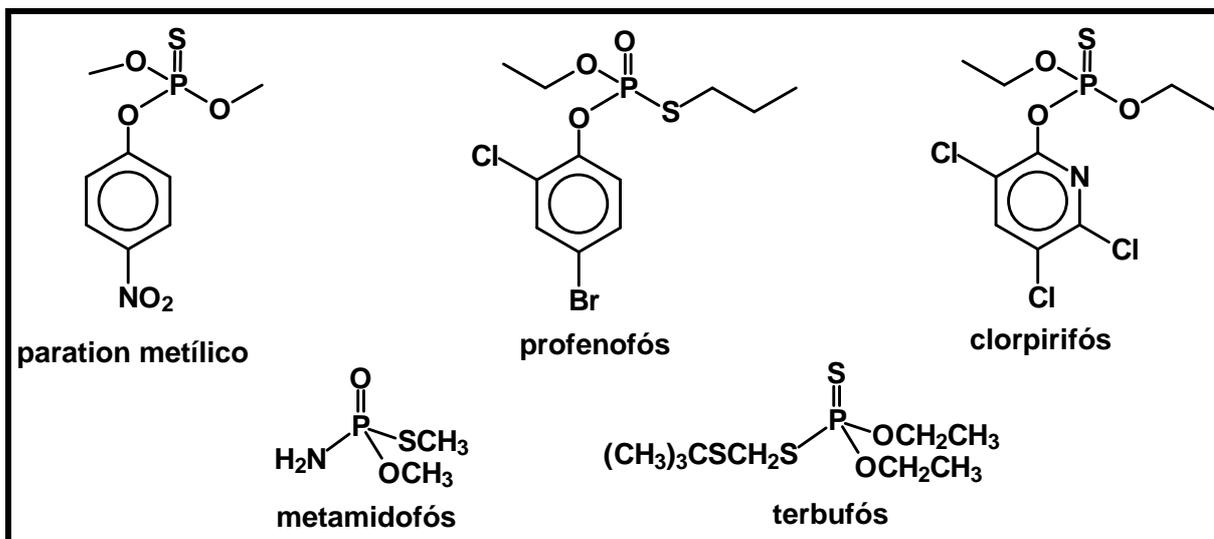


Figura 3: Estruturas de alguns pesticidas organofosforados.

1.2.3 Toxicidade

Embora existam outras ações tóxicas dos pesticidas organofosforados, tais como: inibição de carboxilases e lipases, ativação de proteínas do tipo quinases (PKC, do inglês *protein kinase*), formação de espécies oxidativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) com posterior estresse de diversos tecidos, dentre outras (Dzyadevych e chovelon, 2002; Čolović *et al.*, 2011; Eleršek e Filipič,

2011), a mais citada e estudada no meio científico é a da inibição da AChE (Fukuto e Metcalf, 1956; Fukuto, 1990; Gälli *et al.*, 1994; Dzyadevych e chovelon, 2002; Eleršek e Filipič, 2011; Čolović *et al.*, 2011; Patrick, 2013).

Essa enzima está presente na maioria dos seres vivos e tem como função hidrolisar, em colina e ácido acético, o neurotransmissor chamado de acetilcolina (Figura 4). Nos seres humanos, por exemplo, a acetilcolina permite que informações passadas pelo sistema nervoso central cheguem a diferentes órgãos e glândulas do corpo auxiliando no pleno funcionamento dos mesmos. O acúmulo inadequado dessa substância, devido à inibição da AChE, pode acarretar o mau funcionamento de vários desses órgãos e glândulas e, dependendo do excesso, levar à morte (Brasil, 1998; Patrick, 2013).

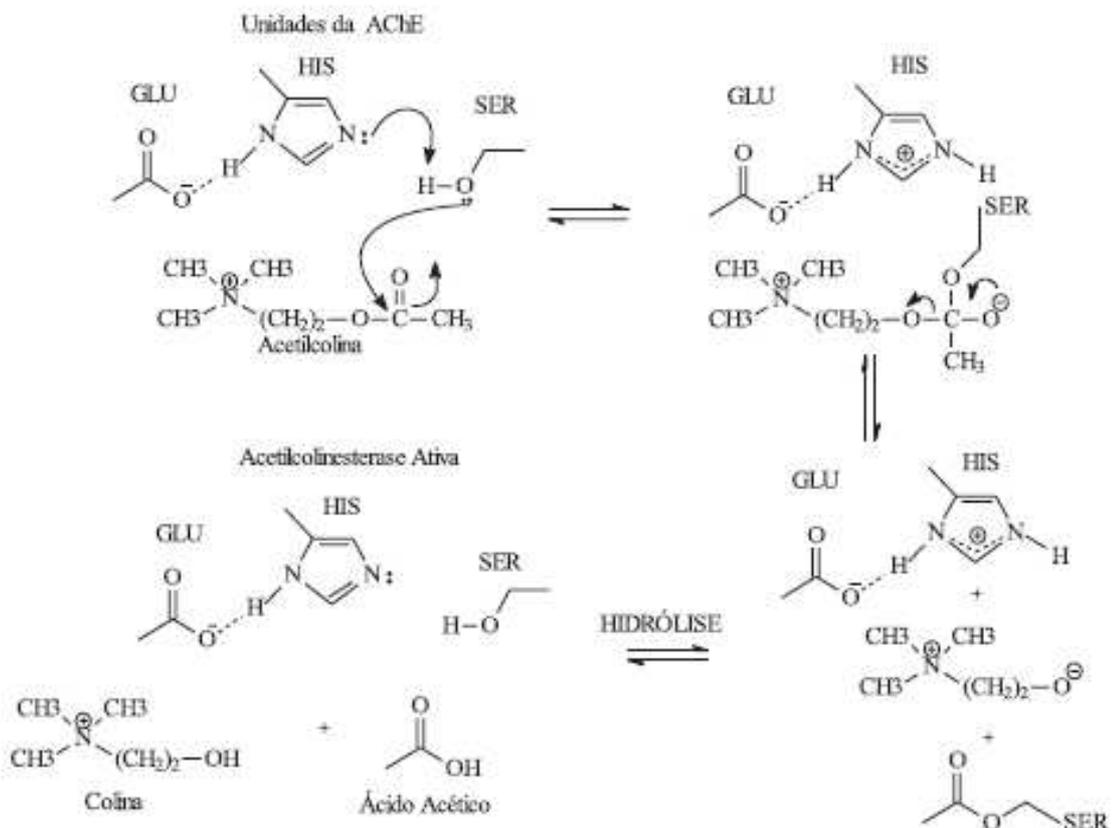


Figura 4: Mecanismo da quebra da acetilcolina em ácido acético e colina catalisada pela AChE (Extraído de Santos *et al.*, 2007).

Como pode ser visto com detalhes na Figura 4, os resíduos de aminoácido: serina (SER), histidina (HIS) e ácido glutâmico (GLU), a tríade catalítica presente no sítio ativo da AChE, desempenham importante papel na catálise da hidrólise da

acetilcolina promovida pela AChE. Como pode ser observado, a serina tem a função de realizar o ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da acetilcolina, enquanto que, a histidina e o ácido glutâmico vão auxiliar nesse ataque (Houghton *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007; Patrick, 2013).

Grande parte dos pesticidas organofosforados podem se ligar ao sítio ativo da enzima inibindo-a ou, até mesmo, inativando-a. Essa inibição acontece porque há o ataque nucleofílico do resíduo de serina ao fósforo do pesticida, o que faz com que a enzima seja fosforilada (Figura 5). A formação da ligação fósforo-oxigênio, a qual é extremamente forte, dificulta o processo de recuperação da enzima. Ou seja, a reação da enzima fosforilada com a água é um processo mais lento do que a hidrólise da enzima acetilada (Figura 4), o que faz com que a enzima se encontre inibida. Em alguns casos, que dependem da velocidade da hidrólise da enzima fosforilada e da estrutura do pesticida organofosforado, a enzima pode ser ainda inativada. Esse processo, o qual é mostrado na Figura 5, é conhecido como envelhecimento (do inglês *aging*). Ele consiste na desalquilação do pesticida organofosforado após a sua ligação com a enzima, seguido da forte interação entre o oxigênio negativo e a histidina protonada (Santos *et al.*, 2007; Patrick, 2013).

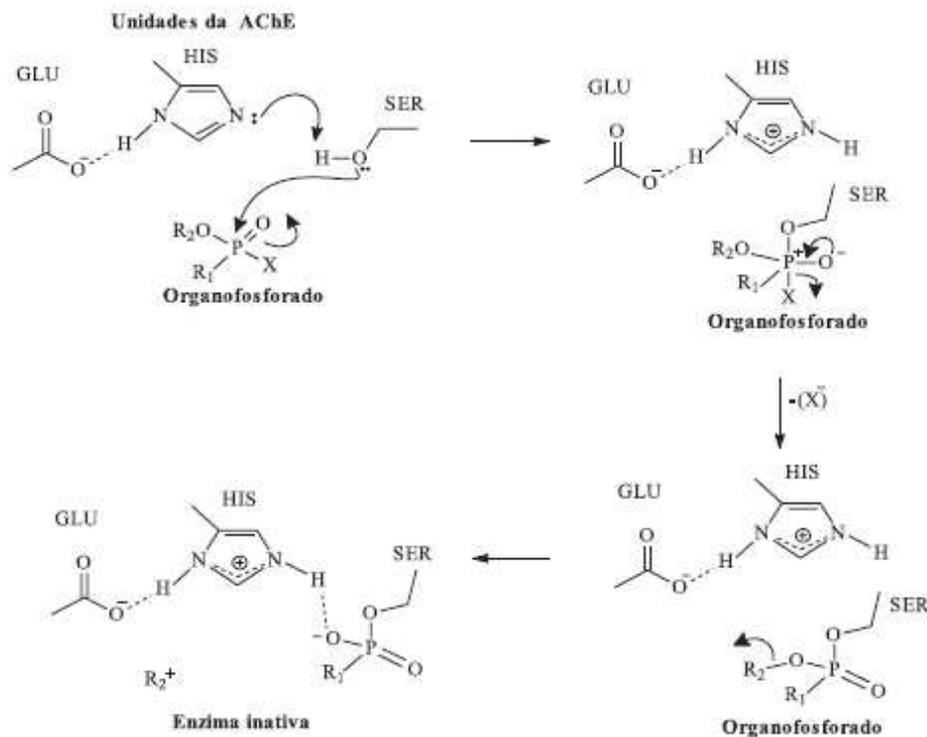


Figura 5: Inibição da AChE por um pesticida organofosforado (Extraído de Santos *et al.*, 2007).

Ainda com relação à inibição da AChE por pesticidas organofosforados, aqueles que possuem a ligação P=O são, geralmente, mais tóxicos que os que possuem a ligação P=S. Isso ocorre porque, como já mencionado, um dos passos cruciais para que ocorra a inibição da AChE pelo organofosforado é o ataque nucleofílico do oxigênio da serina ao fósforo do composto. Desta forma, como o fósforo da ligação P=O possui densidade eletrônica menor que o fósforo da ligação P=S, devido a maior eletronegatividade do O em relação ao S, ele está mais susceptível ao ataque nucleofílico da serina (Fukuto, 1990; Gälli *et al.*, 1994; Dzyadevych e Chovelon, 2002; Santos *et al.*, 2007; Čolović *et al.*, 2011; Patrick, 2013).

Devido a menor toxicidade dos pesticidas organofosforados que possuem a ligação P=S, muitas das substâncias utilizadas comercialmente como inseticidas, possuem essa ligação ao invés da ligação P=O. Isso faz com que essas substâncias sejam menos tóxicas para os mamíferos, mas continuem com elevada ação inseticida. Isso acontece porque, nos insetos, há uma rota metabólica que converte os pesticidas organofosforados que possuem a ligação P=S em seus análogos com a ligação P=O. Após essa transformação, há fosforilação de grande parte das enzimas acetilcolinesterase desses organismos, o que pode levá-los à morte (Figura 6). Já para os mamíferos, felizmente, a rota metabólica é diferente. Com o tempo, os compostos organofosforados são hidrolisados a substâncias mais solúveis, os quais, posteriormente, são excretadas (Figura 6) (Patrick, 2013).

Nesse sentido, como será visto de forma mais detalhada adiante, muitos trabalhos de pesquisa (Castillo *et al.*, 1997; Sakellarides *et al.*, 2003; Druzina e Stegu, 2007; Araújo *et al.*, 2013) relatam que, em determinadas condições, os pesticidas organofosforados que possuem a ligação P=S são convertidos no ambiente aos seus análogos oxigenados com ligação P=O. Esse fato pode ser preocupante, visto que, como já dito, os análogos com ligação P=O são organofosforados potencialmente mais tóxicos.

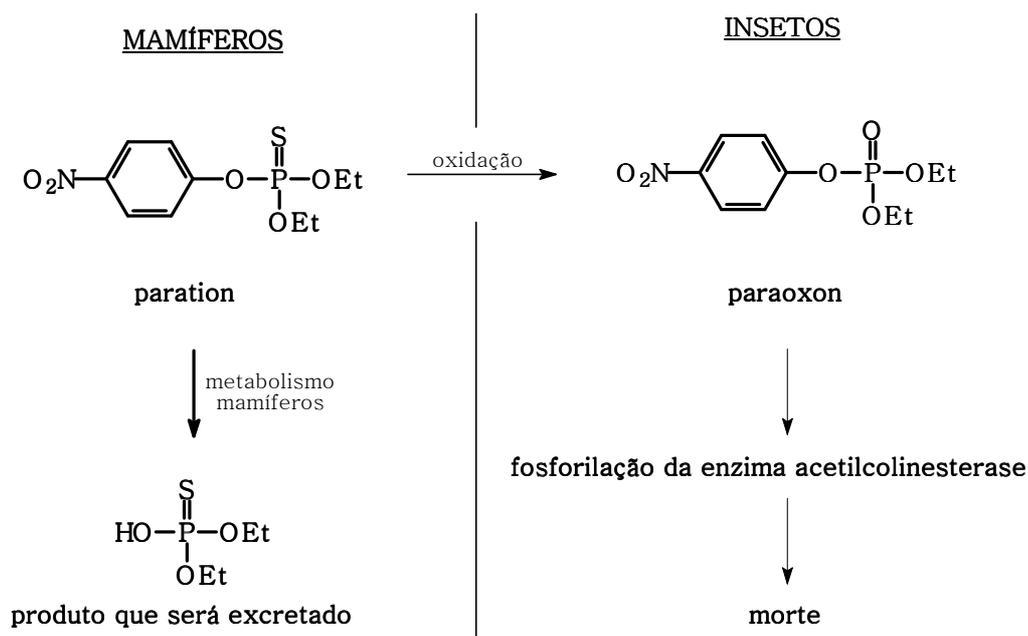


Figura 6: Rotas metabólicas de um pesticida organofosforado em mamíferos e insetos utilizando como exemplo o paration (Adaptado de Patrick, 2013).

1.3 Utilização de pesticidas no Brasil e no mundo e contaminação de ambientes aquáticos naturais

Como foi visto, houve o declínio no uso de pesticidas organoclorados, porém eles foram apenas trocados por outras classes de compostos, tais como: organofosforados, carbamatos, piretróides, triazinas, entre outras. Nesse sentido, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2, o consumo de pesticidas vem aumentando no Brasil e no mundo.

Tabela 1: Consumo de ingredientes ativos de pesticidas, considerando um total de 71 países, nos anos de 2006 e 2010.

Ano	2006	2010
Consumo (tonelada)	207347	220219

Fonte: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2015.

Tabela 2: Venda de ingredientes ativos (em tonelada) de pesticidas no Brasil entre os anos de 2006 e 2013 e do pesticida organofosforado paration metílico.

Ano	2006	2009	2010	2011	2012	2013
Total	200000	300350	384501	422242	477792	495765
Paration metílico	-	2691	1744	1226	1763	1548

Fonte: IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), 2014.

Como pode ser visto na Tabela 1, a qual considera o consumo de pesticidas em um número significativo de países, dentre eles: Argentina, Alemanha, Chile, partes da China, Colômbia, Equador, França, Holanda, Índia, Itália, Japão, Malásia, Peru, Reino Unido, Turquia e Uruguai, o aumento no uso dessas substâncias é de 6 % de 2006 para 2010. Enquanto que, no Brasil, maior consumidor de agrotóxico do mundo desde 2008 (Pedlowski *et al.*, 2012; Pelaez *et al.*, 2013; Brasil, 2015), a venda dessas substâncias aumentou em aproximadamente 92 % no mesmo período (2006-2010) e esse valor chega à 150 % quando se considera o intervalo de 2006 para 2013 (Tabela 2).

No caso específico do consumo de pesticidas organofosforados no nosso país e na região, uma substância que tem uso destacado é o paration metílico (Tabela 2) (Pedlowski *et al.*, 2012; Brasil 2014).

Com o aumento na utilização de pesticidas no Brasil e no mundo, eles vem sendo detectados, já há alguns anos, em diferentes regiões do mundo, nas mais diversas concentrações, em todos os compartimentos do ambiente e, ainda, como resíduos em alimentos, como relatam diversos trabalhos de pesquisa.

No caso específico dos corpos aquáticos, muitos trabalhos (Kammerbauer e Moncada, 1998; Azevedo *et al.*, 2000; Azevedo *et al.*, 2004; Capobiango e Cardeal, 2005; Giordano *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2011; Fadaei *et al.*, 2012) vem encontrando pesticidas, dentre eles muitos organofosforados, nesses ambientes. A Tabela 3 apresenta um resumo dos resultados encontrados nesses estudos.

Tabela 3: Resumo dos resultados encontrados em trabalhos que avaliam a contaminação de corpos aquáticos por pesticidas.

	Local	Ano de coleta	Corpo(s) aquático(s)	Composto(s) detectado(s) com maior frequência	Concentração média máxima^a ou maior concentração^b detectada
1	Honduras	1995 a 97	rio, lagunas e poços	heptacloro, endosulfan e clorpirifós*	2,00 ^a ppm (propiconazol)
2	Portugal	1999	rio	atrazina, simazina e 2,3,6-triclorofenol	5,43 ^b ppb (alaclor)
3	Brasil	2001 e 02	rio	atrazina e igrarol	0,231 ^b (atrazina)
4	Brasil	2002 e 03	rio	forato	242 ^b ppb (forato)
5	Chile	2009	rio	cipermetrina e fenvalerato*	65 ^b ppb (fenvalerato)
6	Brasil	2011	rio e água de torneira	dimetoato*, etion* e metil paration*	2,99 ^b ppb (dimetoato)
7	Irã	2010 e 11	rio	diazinon* e malation*	769 ^b ppb (diazinon)

1 - Kammerbauer e Moncada (1998); 2 - Azevedo e colaboradores (2000); 3 - Azevedo e colaboradores (2004); 4 - Capobianco e Cardeal (2005); 5 - Giordano e colaboradores (2011); 6 - Pinheiro e colaboradores (2011); 7 - Fadaei e colaboradores (2012). *Pesticidas organofosforados.

Como visto até aqui, os pesticidas organofosforados estão entre os mais usados nos últimos anos e, por isso, eles vem sendo cada vez mais encontrados em ambientes aquáticos naturais. Desta forma, como essa classe de substâncias é reconhecidamente tóxica para o homem e seres vivos de maneira geral (Baird e Cann, 2011; Eleršek e Filipič, 2011; Kavvalakis e Tsatsakis, 2012; Patrick, 2013) é importante que sejam realizados estudos que busquem compreender melhor o que ocorre com essas substâncias quando as mesmas alcançam esses ambientes. Nesse sentido, já existem trabalhos na literatura que foram desenvolvidos com esse objetivo e, baseados nos mesmos, os próximos itens da introdução apresentarão alguns processos que podem ocorrer com os pesticidas organofosforados em águas naturais. Além disso, serão apresentados alguns trabalhos encontrados na literatura que foram realizados com objetivos bem similares ao do presente estudo visando mostrar como eles foram feitos e, também, destacar os pontos que ainda devem ser mais bem estudados.

1.4 Comportamento dos pesticidas em ambientes aquáticos naturais

Segundo alguns trabalhos, quando os pesticidas alcançam um corpo aquático, eles podem, por exemplo, ser absorvidos pelo tecido adiposo de animais aquáticos ou ainda adsorvidos por sólidos em suspensão na água, podem ser transferidos para o sedimento, podem permanecer na água por muito tempo, podem sofrer processos bióticos e abióticos de degradação, dentre outras possibilidades (Wolfe *et al.*, 1990; Ware, 2001; Almeida, 2003; Baird e Cann, 2011). A princípio, considerava-se que as transformações bióticas controlavam a degradação dos pesticidas em ambientes naturais. Entretanto, sabe-se atualmente que, em diversos casos, os processos abióticos de degradação, tais como: reações de hidrólise e redox, também são de elevada importância (Wolfe *et al.*, 1990). A seguir, alguns processos de degradação abióticos serão apresentados com mais detalhes.

1.4.1 Reações de hidrólise

O termo hidrólise refere-se à reação de um composto com água onde uma ou mais ligações são rompidas e os produtos da reação incorporam os elementos da molécula de água. Esse tipo de transformação, no caso de compostos orgânicos, frequentemente resulta na troca de um grupo X, de um composto orgânico, RX, por um grupo OH da água, o que pode ser escrito como: $RX + HOH \rightarrow ROH + HX$ (Wolfe *et al.*, 1990).

É conveniente classificar as reações de hidrólise em três categorias: hidrólises ácida, básica e neutra. Na hidrólise ácida, um ácido, usualmente um próton (H^+), catalisa a quebra da ligação. Nesse caso a hidrólise é acelerada pelo acréscimo na concentração do próton, e por esta razão, sua velocidade aumenta quando o pH diminui. No caso da hidrólise básica, íons hidroxila atuam como nucleófilos e são consumidos na reação. Nesse caso, a hidrólise é acelerada pelo acréscimo na concentração dos íons hidroxila, e por esta razão, sua velocidade diminui com o decréscimo do pH. No terceiro tipo de hidrólise, a velocidade da reação independe da concentração de ácido ou base. As hidrólises neutra e alcalina são as reações mais comuns nos ambientes aquáticos naturais (Wolfe *et al.*, 1990).

A hidrólise de pesticidas organofosforados é talvez o processo mais estudado (Pehkonen e Zhang, 2002). Ela pode ocorrer através de mecanismos homogêneos, onde H_2O e OH^- atuam como nucleófilos. Alguns íons metálicos dissolvidos (ex. Cu^{2+} para o diazinon e Hg^{2+} para o malation, fenitrothion e paration metílico) podem ainda catalisar essas reações (Mortland e Raman, 1967; Wan *et al.*, 1994).

Outro caminho para essas reações é a catálise heterogênea, onde óxidos ou hidróxidos metálicos e diferentes argilas podem atuar como catalisadores devido à presença de sítios em sua superfície, onde os pesticidas organofosforados e os nucleófilos podem reagir (Dannenberg e Pehkonen, 1998; Pehkonen e Zhang, 2002). Dannenberg e Pehkonen (1998), por exemplo, avaliaram a hidrólise de quatro pesticidas organofosforados (dissulfoton, diazinon, demeton-S e tiometon) na presença de hidróxido de alumínio e três óxidos de ferro ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\text{Fe}_5\text{HO}_8\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\alpha\text{-FeOOH}$) e verificaram que a presença desses sólidos pode aumentar ou diminuir a taxa de hidrólise desses compostos. A hidrólise do tiometon e o diazinon foram as mais susceptíveis à catálise, sendo o hidróxido de alumínio e o $\alpha\text{-FeOOH}$ os catalisadores mais efetivos. Comber (1999) também avaliou a presença de alguns desses catalisadores e verificou que não foram efetivos para acelerar a hidrólise da atrazina e da simazina.

1.4.2 Reações redox

Nessa classe de reações estão incluídas as oxidações mediadas pela luz solar (fotoassistidas) e as promovidas diretamente por oxidantes presentes nas águas naturais (não fotoassistidas). Algumas espécies, tais como: oxigênio dissolvido, ozônio, íons metálicos, matéria orgânica dissolvida, dentre outras, podem oxidar de maneira não fotolítica alguns pesticidas nesses ambientes (Wolfe *et al.*, 1990; Pehkonen e Zhang, 2002). Vale ressaltar que, alguns autores preferem separar esses dois tipos de reações denominando de reações de fotodegradação, as mediadas pela luz solar, e reações de oxidação, as demais (Pehkonen e Zhang, 2002). As reações mediadas pela luz solar ocorrem basicamente por dois processos: **fotólise direta e indireta**.

Na **fotólise direta**, a degradação do composto ocorre porque o mesmo absorveu radiação solar ($\lambda \geq 290$ nm). Essa absorção direta de energia pode, por exemplo, resultar em clivagem de ligação, dimerização ou rearranjo na estrutura

química do poluente. Como a camada de ozônio absorve a radiação proveniente do sol de comprimento de onda inferior a 290 nm, os compostos que não possuem absorção em comprimentos de onda superiores a esse não sofrem fotólise direta nesses ambientes, ou seja, esse tipo de processo é dependente do espectro de absorção do pesticida (Wolfe *et al.*, 1990; Mansour *et al.*, 1999). Essa dependência é comprovada com os resultados obtidos no trabalho de Santos e Rezende (2002), onde o pesticida paration etílico, em solução aquosa e nas mesmas condições, apresentou taxas de degradação diferentes quando foi utilizada radiação eletromagnética com faixas de comprimento de onda distintos ($\lambda > 280$ nm e $\lambda > 313$ nm). Quando comprimentos de onda superiores a 280 nm foram utilizados, sua degradação ocorreu rapidamente, enquanto que, quando apenas comprimentos de onda superiores a 313 nm foram utilizados, sua degradação praticamente não ocorreu.

No caso da **fotólise indireta**, a absorção de radiação por outro composto presente no meio (sensibilizador) resulta na degradação do poluente. Em uma possível situação, o composto excitado transfere energia ou elétron para o pesticida, o qual pode sofrer alguns processos, tais como: homólise, heterólise ou fotoionização (Burrows *et al.*, 2002). Numa outra situação, a excitação do composto resulta na formação de espécies reativas, as quais iniciam uma série de reações que levam à degradação do pesticida (Wolfe *et al.*, 1990; Mansour *et al.*, 1999). Na Figura 7 há a representação desses possíveis caminhos.

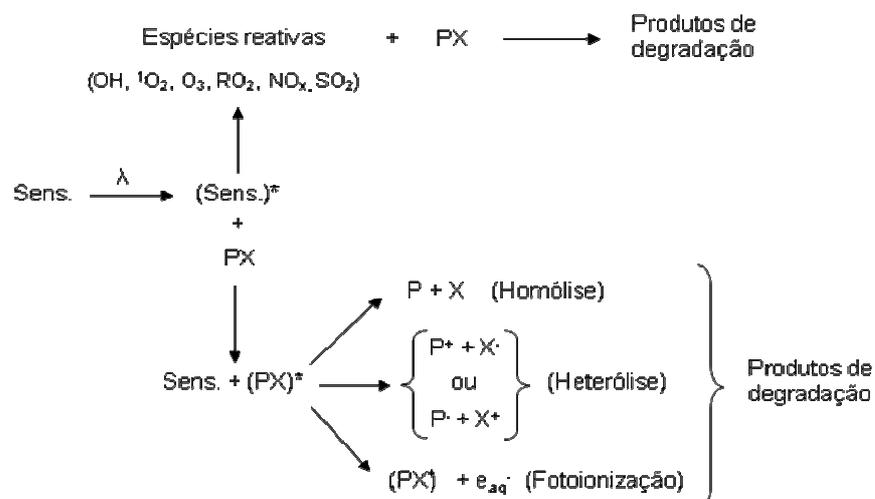


Figura 7: Possíveis caminhos para a degradação do pesticida via fotólise indireta (Sens.=Sensibilizador; PX=Pesticida) (Adaptado de Burrows *et al.* (2002) e Mansour *et al.* (1999)).

As substâncias húmicas (SH), substâncias presentes em muitos ambientes aquáticos naturais e que são constituídas de macromoléculas complexas provenientes da decomposição de plantas e resíduos de animais, podem atuar como sensibilizadores. Estas substâncias são operacionalmente classificadas em três principais frações: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e humina (IHSS, 2007). Essas substâncias podem absorver energia e, posteriormente, transferir ao poluente o qual poderá ter a sua degradação iniciada, ou ainda, devido à presença de vários grupos funcionais, tais como: carboxilas, hidroxilas alcoólicas e fenólicas, carbonilas, ésteres e etc, podem absorver energia e gerar as espécies reativas descritas na Figura 7, as quais podem reagir posteriormente com o poluente. Em ambos os casos, caracteriza-se a degradação via fotólise indireta (Mansour *et al.*, 1999; Burrows *et al.*, 2002 e Santos e Rezende, 2002).

Vale ressaltar que, mesmo que as SH participem efetivamente da fotólise indireta dos pesticidas, nem sempre a sua presença ou, ainda, o aumento na sua concentração, faz com que a taxa de degradação do pesticida aumente no meio. A diminuição na taxa de degradação observada para alguns pesticidas na presença das SH ou, ainda, em determinadas faixas de concentração de SH, ocorre porque os pesticidas podem se ligar as SH, tendo assim a sua degradação dificultada, ou ainda, as mesmas podem absorver parte da radiação que seria utilizada pelo pesticida para promover a sua fotólise direta, diminuindo assim, a taxa de degradação do mesmo via esse processo. Desta forma, caso o aumento na taxa de degradação do pesticida via fotólise indireta não compense a diminuição ocasionada na taxa de degradação do pesticida por fotólise direta, uma diminuição na taxa de degradação do composto é observada (Bachman e Patterson, 1999; Garbin *et al.*, 2007).

Nesse sentido, Garbin e colaboradores (2007) avaliaram a degradação via fotólise direta e indireta de três pesticidas (atrazina, imazaquin e iprodione) em água ultrapura e em soluções contendo diferentes concentrações de SH (AH e AF) e observaram que no caso do imazaquin, composto que sofre degradação via fotólise direta em larga extensão, a presença de SH sempre diminuiu a sua taxa de degradação, enquanto que, no caso dos demais pesticidas, somente em faixas específicas de concentração das SH observou-se uma taxa de degradação mais elevada dos mesmos no meio.

1.5 Degradação de pesticidas organofosforados em ambientes aquáticos naturais sob ação da radiação solar

No item anterior, os principais processos abióticos que levam à degradação de um pesticida em solução aquosa foram apresentados. Muitos dos trabalhos citados fizeram os testes com lâmpadas e as soluções eram preparadas com água desionizada com a adição ou não de substâncias húmicas ou de outras substâncias que poderiam influenciar no processo de degradação. Um dos objetivos era compreender de maneira mais adequada os processos que levam à degradação dos pesticidas em matrizes aquosas para que se possa extrapolar esse conhecimento para o que ocorre com os mesmos na natureza. Trabalhos como esses são extremamente relevantes, pois, com testes rápidos, tem-se ideia do que pode ocorrer com os pesticidas em ambientes aquáticos naturais. Porém, a realização de ensaios mais reais, com águas naturais e luz solar como fonte de radiação, é imprescindível para que se tenha mais informações do que ocorre com essas substâncias quando as mesmas alcançam esses ambientes. Essa perspectiva foi explorada no presente trabalho e nesse item da introdução, como já mencionado, serão apresentados alguns estudos que tiveram esse foco visando mostrar como eles foram realizados e, também, destacar os pontos que ainda devem ser mais bem estudados.

Um dos trabalhos iniciais que possui essa linha e que mais se assemelha aos desenvolvidos atualmente foi o realizado por Lartiges e Garrigues (1995) na França. Esses pesquisadores avaliaram a degradação de 19 pesticidas (dentre eles, dezesseis organofosforados) em água de rio, de mar e, para comparar, em água ultrapura (MilliQ). Essas águas apresentavam diferentes valores de pH e as soluções preparadas foram mantidas em diferentes temperaturas, sendo, ainda, expostas ou não à radiação solar. Esse trabalho teve um total de dez condições sendo avaliadas e um resumo das mesmas é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Diferentes condições avaliadas no trabalho Lartiges e Garrigues (1995) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do paration metílico (PME) nas mesmas.

Condições	Matrizes aquosas utilizadas	pH	T (°C)	$t_{1/2}$ do PME (dias)
1	ultrapura	6,1	6	237
2	ultrapura	6,1	22	46
3	rio	7,3	6	95
4	rio	7,3	22	23
5	rio	7,3	-2 a 25 ^a	11
6	rio filtrada	7,3	6	173
7	rio filtrada	7,3	22	18
8	mar	8,1	6	233
9	mar	8,1	22	30
10	mar	8,1	-2 a 25 ^a	34

^aSoluções expostas diretamente à radiação solar.

De modo geral, os resultados mostraram que a elevação da temperatura, o aumento do pH, o uso de águas naturais, a maior quantidade de material particulado e a exposição direta das soluções à radiação solar aumentaram as taxas de degradação dos pesticidas em estudo. No caso específico do paration metílico, composto que foi avaliado no presente trabalho, os tempos de meia-vida encontrados são mostrados na Tabela 4.

Castillo e colaboradores (1997) avaliaram a degradação de três pesticidas organofosforados, de um pesticida organoclorado e de alguns subprodutos desses compostos em três tipos de águas naturais, rio, estuário e subterrânea, coletadas em Portugal. Essas águas apresentavam os respectivos valores de pH: 7,8; 8,1 e 7,4 e todas as soluções foram expostas diretamente à radiação solar sem proteção. As temperaturas mínima e máxima do ambiente durante a realização do experimento, bem como as suas variações, foram $13 \pm 3^{\circ}\text{C}$ a $21 \pm 5^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Os resultados mostraram diferenças entre os tempos de meia-vida desses compostos nas águas utilizadas. No geral, o tempo de meia-vida variou de 0,07 dias (pentaclorofenol) até 5 dias (4-nitrofenol). No caso específico do paration metílico, os tempos de meia-vida encontrados foram de 3, 4 e 4 dias, para a água subterrânea, de estuário e de rio, respectivamente. Nesse trabalho, foram ainda identificados outros subprodutos dos pesticidas em estudo utilizando-se cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-APCl-MS).

Sakellarides e colaboradores (2003) avaliaram a degradação de quatro pesticidas organofosforados em quatro tipos de águas naturais coletadas na Grécia e em água destilada para comparação. As soluções foram expostas à radiação solar, sendo que, algumas foram protegidas com papel alumínio para avaliação de processos de degradação não fotoassistidos. No total, dez condições foram testadas e um resumo das mesmas encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5: Diferentes condições estudadas por Sakellarides e colaboradores (2003).

Condições	Matrizes	pH	T (°C)	Exposição direta ao sol
1	destilada	5,89	7,8 a 37,2	X
2	destilada			
3	lago	8,45	médias da temperatura	X
4	lago			
5	mar	7,45	mínima e máxima	X
6	mar			
7	rio	7,62		X
8	rio			
9	subterrânea	7,22		X
10	subterrânea			

Nesse trabalho, os pesquisadores apresentaram apenas os dados referentes ao processo de fotodegradação. Ou seja, antes de se determinar as constantes cinéticas, eles subtraíram os valores de concentração obtidos para os pesticidas nas soluções que foram expostas protegidas com papel alumínio, dos encontrados nas soluções expostas diretamente à radiação solar. De modo geral, os resultados mostraram que a utilização de águas naturais aumentou a taxa de degradação dos pesticidas em estudo. No caso específico do paration metílico, os tempos de meia-vida encontrados foram de: 35,4; 27,5; 27,3; 25,6 e 24,6 dias, respectivamente, para as águas destilada, subterrânea, de mar, de lago e de rio. Ou seja, parece que a matéria orgânica dissolvida acelera a fotodegradação desse pesticida, uma vez que, a água destilada, subterrânea e de mar possuem baixa concentração de carbono orgânico dissolvido, enquanto que, as demais possuem concentração mais elevada. Nesse trabalho, foram ainda identificados alguns subprodutos dos pesticidas através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), sendo encontrados, dentre outras substâncias, os análogos dos pesticidas originais com a ligação P=O nas soluções que foram expostas diretamente à radiação solar.

Araújo (2006) avaliou a degradação do paration metílico formulado (Folipuser 600-Br da Agripec) em dois tipos de águas naturais coletadas no Brasil (lago e rio), “in natura” e esterilizada, e em solução aquosa com e sem ácidos húmicos (AH). Além das diferentes matrizes aquosas usadas, diferentes concentrações iniciais de paration metílico e a exposição direta ou não à radiação solar também foram parâmetros avaliados nesse trabalho. No total, 17 condições foram estudadas no mesmo, estando algumas resumidas na Tabela 6.

Tabela 6: Diferentes condições avaliadas no trabalho de Araújo (2006) e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) do paration metílico (PME) nas mesmas.

Condições	Matrizes	pH	T (°C)	$t_{1/2}$ do PME (dias)	
				escuro ^d	claro ^e
1 e 2	ultrapura ^a	5,20	25±1 a 40±3 ^c	32	11,89
3 e 4	ultrapura ^b	6,95	20±1 a 37±7 ^c	36	16
5 e 6	solução com AH ^b	6,97		19	4,89
7 e 8	lago “in natura” ^b	6,80		6,48	4,41
9 e 10	lago esterilizada ^b	6,80	23±2 a 30±2 ^c	24	4,46
11	solução com AH ^b	7,00		-	3,01
12 e 13	rio “in natura” ^b	7,80		3,72	2,75
14 e 15	rio esterilizada ^b	8,00	22±3 a 43±3 ^c	5,37	3,47
16	solução com AH ^b	7,00		-	2,82

^aConcentração inicial de PME: 88 mg L⁻¹; ^bConcentração inicial de PME: 200 µg L⁻¹; ^cMédias das temperaturas mínima e máxima do ambiente e suas respectivas variações; ^dSoluções expostas à radiação solar envolvidas com papel alumínio; ^eSoluções expostas diretamente à radiação solar.

De modo geral, como pode ser observado na Tabela 6, os resultados desse trabalho mostraram que a degradação do paration metílico sofreu influência do tipo de água natural utilizada. Em água de lago, processos bióticos, aparentemente, foram preponderantes para levar à degradação do pesticida, enquanto que, em água de rio, processos redox não mediados pela luz solar foram, aparentemente, os processos principais para a degradação do mesmo. A exposição direta ao sol sempre diminuiu o tempo de meia-vida do pesticida, indicando assim que a radiação solar desempenha importante papel na degradação do paration metílico. Assim como no trabalho de Sakellarides e colaboradores (2003), nesse trabalho, o pesquisador também identificou alguns dos subprodutos do pesticida em estudo utilizando CG/EM. Araújo (2006) também detectou, somente nas soluções expostas diretamente a radiação solar, o análogo com ligação P=O do pesticida inicial. Porém,

quando foi utilizada a concentração inicial mais alta do paration metílico (88 mg L^{-1}) e a solução foi exposta diretamente à radiação solar foi identificado, apenas através da interpretação de espectros de massas obtidos, um subproduto inédito da degradação fotoquímica do pesticida, o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato.

Druzina e Stegu (2007) avaliaram a degradação de 15 pesticidas organofosforados em dois tipos de águas naturais, rio e subterrânea, da Eslovênia. Além das diferentes águas naturais, a exposição direta ou não à radiação solar, em frascos abertos ou fechados, diferentes temperaturas de armazenamento e diferentes valores de pH foram parâmetros avaliados nesse trabalho. Um total de 9 condições foram estudadas no mesmo, estando-as resumidas na Tabela 7.

Tabela 7: Diferentes condições estudadas no trabalho Stegu e Druzina (2007) e os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) do paration metílico (PME) nas mesmas.

Condições	Matrizes	pH	T (°C)	Outras informações	$t_{1/2}$ do PME (dias)
1	subterrânea	7	4	-	estável
2	subterrânea	6	25	-	45,5
3	subterrânea	7	25	-	47,2
4	subterrânea	8,5	25	-	47,6
5	rio Savinja	8	4	-	123,8
6	rio Savinja	8	25	-	18,1
7	rio Kamniska Bistrica	8	- 15,7/16,2 ^a	frasco fechado	19,7
8	rio Kamniska Bistrica	8	- 15,7/16,2 ^a	frasco fechado protegido com papel alumínio	estável
9	rio Kamniska Bistrica	8	- 15,7/16,2 ^a	frasco aberto	15,8

^aSoluções expostas diretamente à radiação solar.

De modo geral, os resultados mostraram que a variação do pH não alterou o tempo de meia vida da maioria dos pesticidas estudados, que a biodegradação aumentou a taxa de decomposição de 6 dos 15 pesticidas organofosforados, que a elevação da temperatura e a exposição direta, sem proteção, das soluções à radiação solar, principalmente as expostas em recipiente aberto, aumentaram as taxas de degradação da maioria dos pesticidas em estudo. No caso específico do paration metílico, composto que foi estudado no presente trabalho, o tempo de meia-vida é mostrado na Tabela 7. Assim como no trabalho de Sakellarides e

colaboradores (2003) e Araújo (2006), nesse trabalho, os pesquisadores identificaram alguns subprodutos dos pesticidas em estudo, utilizando CG/EM. Eles também encontraram, somente nas soluções expostas diretamente à radiação solar, os análogos com ligação P=O dos pesticidas iniciais.

Analisando-se todos os trabalhos apresentados neste item, observa-se inicialmente que, dependendo das condições testadas, a variação observada no tempo de meia-vida de um determinado pesticida é elevada. No caso do paration metílico, por exemplo, composto que teve a sua degradação avaliada nos cinco trabalhos apresentados, o tempo de meia-vida variou de 2,75 dias (água de rio, pH=7,8, exposição direta à radiação solar, 11 h de luminosidade média, temperatura variando de aproximadamente 22 a 43 °C) no trabalho de Araújo (2006) até ser considerado totalmente estável (água subterrânea ou de rio, pH=7 ou 8, sem exposição direta à radiação solar, temperatura constante de 4 °C ou variando de aproximadamente -15,7 a 16,2 °C) no trabalho de Druzina e Stegu (2007). Mesmo quando se compara o tempo de meia-vida desse composto em condições nas quais as soluções são preparadas a partir de águas de ambientes semelhantes, água de rio, por exemplo, e as mesmas são expostas diretamente à radiação solar, grandes variações são encontradas. Novamente, desde 2,75 dias, tempo de meia-vida encontrado no trabalho de Araújo (2006), até 19,7 dias, tempo de meia-vida encontrado no trabalho de Druzina e Stegu (2007). Isso ocorre, também, porque as condições climáticas onde os testes são realizados e as características das águas naturais utilizadas nos mesmos são diferentes. Elas são dependentes dos locais onde os testes são realizados e, na sua grande maioria, os mesmos são conduzidos em países do hemisfério norte. Desta forma, ressalta-se que, para se obter dados que auxiliem a inferir o risco, de maneira mais exata, da presença dessas substâncias em águas naturais da nossa região, experimentos utilizando essas águas, nas condições climáticas típicas do Brasil e com pesticidas intensamente utilizados no nosso país, devem ser realizados.

Além disso, observa-se que praticamente todos os trabalhos apresentados analisaram a formação de subprodutos durante os experimentos, identificando inclusive os análogos oxigenados potencialmente mais tóxicos que os pesticidas originais nas soluções expostas diretamente à radiação solar. Porém, nenhum dos autores citados avaliou a toxicidade da solução durante os testes para verificar se a

mesma aumentava ou diminuía conforme ocorria a degradação do(s) pesticida(s) em estudo. Nesse sentido, como será visto com mais detalhes no próximo item da introdução, alguns trabalhos começam a realizar esse tipo de procedimento. Porém, acredita-se que ele ainda é pouco utilizado e, desta forma, foi explorado no presente trabalho.

Ainda com relação aos subprodutos analisados, observa-se que Araújo (2006) propôs a formação de um subproduto inédito oriundo da degradação fotoquímica do paration metílico, o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato. Essa proposição foi realizada baseada apenas na interpretação do espectro de massas obtido para essa substância nos testes de degradação. Sendo assim, acredita-se que realizar a síntese do mesmo para que a sua toxicidade seja avaliada e comparada com a do pesticida original e a de outros subprodutos citados na literatura seja um procedimento importante e também foi um dos pontos explorados.

1.6 Utilização de testes de toxicidade ou de neutotoxicidade para acompanhar a degradação de pesticidas organofosforados em matrizes aquosas

Observa-se na literatura uma recente e, ainda, pouco explorada tendência em se usar testes de toxicidade ou de neurotoxicidade como ferramentas adicionais para se acompanhar a degradação de pesticidas organofosforados em matrizes aquosas (Dzyadevych e Chovelon, 2002; Zoh *et al.*, 2006; Kralj *et al.*, 2007a e b; Čolović *et al.*, 2010). Além da utilização das técnicas analíticas (ex. cromatografia gasosa ou líquida) para quantificar o pesticida e, em alguns casos, os seus subprodutos ao longo do estudo da degradação, utiliza-se um ou mais testes para verificar o que ocorre com a toxicidade da solução conforme há a diminuição da concentração do pesticida. Esse procedimento é mais utilizado em trabalhos de remediação de efluentes contendo pesticidas por processos oxidativos avançados (POAs) ou pelo uso da radiação oriunda de lâmpadas (Dzyadevych e Cholevon, 2002; Kralj *et al.*, 2007a e b; Čolocović *et al.*, 2010). O mesmo visa, por exemplo, verificar se há a formação de subprodutos mais tóxicos que os pesticidas originais conforme a degradação dos mesmos ocorre e, ainda, verificar o tempo de tratamento necessário para fazer com que a toxicidade da solução seja desprezível.

Com relação aos testes que vem sendo utilizados na literatura com esses objetivos, destacam-se: o que utiliza um tipo de crustáceo (*Daphnia Magna*), o que utiliza um tipo de bactéria (*Vibrio Fischeri*) e o que avalia a inibição da enzima AChE (Gälli *et al.*, 1994; Dzyadevych e Chovelon, 2002; Zoh *et al.*, 2006; Kralj *et al.*, 2007a e b; Čolović *et al.*, 2010; Aydin *et al.*, 2011). Entre esses testes, o que avalia a inibição da AChE tem as vantagens de ser facilmente realizado em laboratório de química por não haver a necessidade de se trabalhar sempre com um ser vivo, tem relação direta com a principal ação tóxica dos pesticidas organofosforados, como visto no item 1.2.3 deste capítulo, e, ainda, é extremamente sensível a presença de alguns pesticidas organofosforados de elevada toxicidade (Gälli *et al.*, 1994; Dzyadevych e Chovelon, 2002; Kralj *et al.*, 2007a e b; Čolović *et al.*, 2010 e 2011).

Kralj e colaboradores (2007a e b) e Čolović e colaboradores (2010), por exemplo, utilizaram esse teste para avaliar a toxicidade da solução ao longo da fotodegradação, na presença ou na ausência de TiO₂ (fotocatalisador), de alguns pesticidas organofosforados. Em todos os casos foram utilizados um tempo de 120 minutos de exposição das soluções a radiação proveniente de uma lâmpada parabólica de xenônio de 125 W. De forma mais detalhada, Kralj e colaboradores (2007a e b) avaliaram a degradação do azinfós-metílico, do clorpirifós, do malation (formulado e padrão) e do malaoxon, em soluções separadas, e utilizaram a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) para determinar a concentração dessas substâncias ao longo do tempo. Enquanto que, Čolović e colaboradores (2010) avaliaram a degradação do diazinon utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra desempenho com detecção por UV-Vis. Em alguns casos foram quantificados ainda alguns subprodutos dos pesticidas em estudo.

De maneira geral, os resultados obtidos mostraram que há variações na toxicidade da solução ao longo da degradação das substâncias testadas. Geralmente, no início dos testes de fotodegradação, há um aumento da toxicidade da solução (aumento da inibição da AChE), enquanto que, ao final do tempo de exposição, a toxicidade é menor que a inicial. Segundo os autores, muito provavelmente, essa tendência geral é observada, pois ocorre a formação com posterior degradação dos análogos oxigenados dos pesticidas sulfurados em estudo durante os testes. Nesse sentido, Kralj e colaboradores (2007b) verificaram que a

toxicidade da solução aumentou ao longo da fotocatalise do malation devido à formação do malaoxon, porém, após os 120 minutos de irradiação, a mesma era extremamente baixa. Em alguns casos, mesmo depois dos 120 minutos de irradiação, a toxicidade da solução continua elevada, mostrando que, ainda há substâncias na mesma que são capazes de inibir a AChE. Nesse sentido, no mesmo trabalho (Kralj *et al.*, 2007b) foi observado que na fotocatalise de uma formulação comercial contendo malation e isomalation, mesmo após os 120 minutos de irradiação, a solução ainda encontrava-se mais tóxica que no início do ensaio. Isso mostra que a degradação desses pesticidas leva a compostos mais tóxicos que os originais. Sendo assim, os resultados obtidos por esses autores indicam que realizar um teste de neurotoxicidade é um procedimento relevante e que deve ser mais explorado pelos autores que avaliam a degradação de pesticidas organofosforados.

Com relação ao procedimento de laboratório utilizado para avaliar a inibição da AChE ao longo da degradação do pesticida organofosforado, todos, de alguma forma, estão baseados no método inicialmente desenvolvido por Ellman e colaboradores (1961). Esses pesquisadores desenvolveram, em 1961, um método colorimétrico de simples execução capaz de determinar a atividade catalítica da AChE e, por sua vez, possível de ser utilizado na determinação da porcentagem de inibição ocasionada por uma substância a essa enzima. Esse método vem sendo usado até hoje em trabalhos científicos com as mais diversas finalidades, dentre eles: trabalhos que usam a atividade dessa enzima como biomarcador ambiental (Kirby *et al.*, 2000; Forget *et al.*, 2003; Matozzo *et al.*, 2005; Linde-Arias *et al.*, 2008), os que buscam medicamentos para o mal de Alzheimer (Houghton *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2007), os que avaliam a toxicidade de pesticidas (Čolocović *et al.*, 2010 e 2011), os que usam testes de neurotoxicidade como ferramenta adicional para acompanhar a degradação de pesticidas (Kralj *et al.*, 2007a e b), dentre outros. Para ter dimensão do quanto esse método é utilizado até hoje basta observar que o artigo no qual ele é descrito (Ellman *et al.*, 1961) foi citado 10532 vezes, na base de dados *Scopus*, de 1970 até o dia 07/07/2015.

Nesse método, a atividade da enzima é determinada acompanhando-se a variação no acréscimo de absorvância, em comprimento de onda específico, de uma solução onde o substrato (geralmente acetilcolina) está sendo hidrolisado pela enzima (Figura 8) na presença do íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB²⁻). O

aumento da absorvância ao longo do tempo ocorre devido à formação do ânion 5-tiol-2-nitrobenzoato (TNB²⁻) de coloração amarela, produto da reação entre a tiocolina e o íon DTNB²⁻ (Figura 9). Sendo assim, quanto maior for o acréscimo de absorvância por um determinado intervalo de tempo, maior é a atividade da enzima, e, comparando-se a atividade de enzimas AChE que foram colocadas em contato com soluções contendo inibidores (ex. pesticidas organofosforados) com a atividade de enzimas que não tiveram esse contato (controle), pode-se chegar à porcentagem de inibição da mesma.

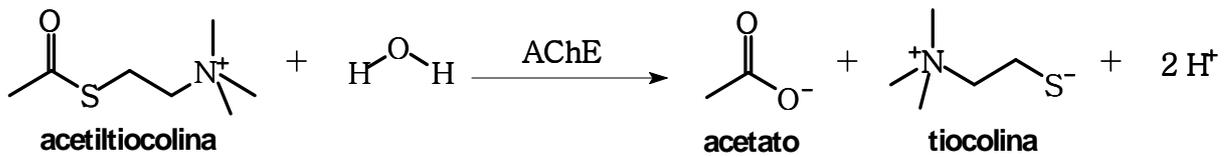


Figura 8: Quebra da acetiltiocolina em acetato e tiocolina promovida pela AChE.

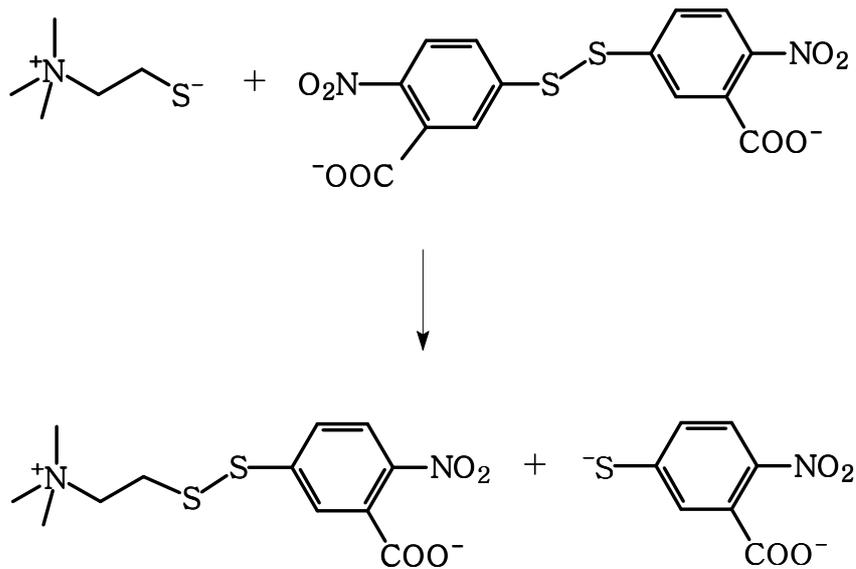


Figura 9: Reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB²⁻) formando, entre outro produto, o ânion 5-tiol-2-nitrobenzoato (TNB²⁻).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar a degradação do paration metílico em diferentes matrizes aquosas sob ação da radiação solar em um ambiente de clima tropical avaliando-se a toxicidade da solução e a formação do paraoxon metílico ao longo desse processo.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato;
- Avaliar a toxicidade do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato frente ao teste de inibição da AChE e comparar com a do paration metílico, paraoxon metílico e *p*-nitrofenol;
 - Propor e validar um método de análise para quantificar o paration metílico e o paraoxon metílico nas diferentes matrizes aquosas utilizadas;
 - Comparar a eficiência da extração em fase sólida para análise das substâncias de interesse utilizando-se dois cartuchos diferentes;
 - Estudar a degradação do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos;
 - Avaliar a degradação biótica e abiótica do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul;
 - Calcular as constantes de velocidade das reações de degradação e o tempo de meia-vida da substância estudada nas diferentes condições testadas;
 - Inferir quais os processos relevantes para a degradação do paration metílico nessas diferentes condições;
 - Utilizar o teste de inibição da AChE para acompanhar a degradação do pesticida em estudo;
 - Relacionar a variação da toxicidade da solução com o desaparecimento do pesticida original e a formação do paraoxon metílico.

CAPÍTULO 2

Avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos frente ao teste de inibição da AChE

Como mencionado no capítulo 1, em sua dissertação de Mestrado, Araújo (2006), estudando a degradação do paration metílico formulado em diferentes matrizes aquosas, propôs a formação de um subproduto inédito, o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato. Essa proposição estava baseada apenas na interpretação do espectro de massas obtido para essa substância nos testes de degradação. Desta forma, antes que fosse realizada a avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos comumente citados na literatura (paraoxon metílico e *p*-nitrofenol) sintetizou-se e a caracterizou-se o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato visando comprovar a proposição feita inicialmente por Araújo (2006) e, também, incluí-lo nos testes de toxicidade. Desta forma, neste capítulo, serão apresentadas as metodologias, resultados e discussões referentes à síntese e caracterização do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato e à avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos frente ao teste de inibição da AChE antes de se apresentar os estudos aprofundados da degradação do paration metílico (capítulos 3 e 4).

1. METODOLOGIA

1.1 Síntese e caracterização do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato

A síntese do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato foi realizada sob orientação do professor Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda (UNICAMP) e baseada no trabalho desenvolvido por Briseño-Roa e colaboradores (2006). Inicialmente, foi realizada a purificação da hidroquinona (Vetec) através da recristalização em acetona (Vetec) e do tetraidrofurano (Vetec) (THF), através da destilação na presença de sódio e benzofenona (Vetec). Uma solução 4,54 mmol de hidroquinona em 10 mL de THF foi adicionada gota-a-gota a uma suspensão, em constante agitação, de 4,54 mmol de hidreto de sódio (Vetec) em 20 mL de THF. Após a adição, a mistura foi aquecida sob refluxo por 30 minutos e, posteriormente, resfriada à temperatura ambiente. O meio reacional foi mantido sob agitação e resfriado entre 0-5 °C. Nessa temperatura, foi adicionada, gota-a-gota, uma solução 4,54 mmol de dimetilclorotiofosfato (Sigma-Aldrich), fosforilante, em 10 mL de THF. Após a adição, a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 30 h. Após esse

tempo, um volume de 20 mL de uma solução saturada de NH_4Cl (Vetec) foi adicionado. A mistura resultante, de coloração amarela, foi agitada durante 15 minutos e, posteriormente, foi adicionado 20 mL de acetato de etila grau pesticida (Tedia). Separou-se a fase orgânica e adicionou-se sulfato de sódio anidro (Vetec) a mesma. Após filtração do sulfato de sódio, a fase orgânica foi concentrada em um sistema rota- evaporador/banho maria (Fisatom 802/550) acoplado a bomba à vácuo (Quimis Q355J), gerando um óleo amarelado. O composto de interesse, O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato, foi separado através de cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel (Merck) como fase estacionária e clorofórmio (Vetec) como fase móvel.

A caracterização do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato foi feita através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (Sistema Shimadzu CG(17-A)/EM(QP 5050)) e de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H (Espectros obtidos a partir de solução do composto em CDCl_3 no espectrômetro Jeol modelo ECLIPSE 400, operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C e tendo como referência interna $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$).

1.2 Avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos frente ao teste de inibição da AChE

A avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos frente ao teste de inibição da AChE foi feita determinando-se os valores de $^1\text{IC}_{50}$ (3 horas) da AChE para os mesmos. Para essas determinações foram preparadas as soluções descritas na Tabela 8. Um solvente orgânico, a acetona, foi escolhido para o preparo das mesmas devido à baixa solubilidade das substâncias utilizadas em água.

Tabela 8: Soluções em acetona grau HPLC (Tedia) utilizadas nos testes para a determinação do IC_{50} (3 horas) da AChE.

Compostos	Concentrações
^a paration metílico, ^a <i>p</i> -nitrofenol e ^b O,O-dimetil O- <i>p</i> -hidroxifenil tiofosfato.	1,00; 10,0; 50,0; 100 e 400 mg L ⁻¹
^a paraoxon metílico	1,00; 10,0; 50,0; 100 e 400 µg L ⁻¹

^aPadrões adquiridos a Pestanal (pureza > 96,0 %); ^bPadrão previamente sintetizado.

¹Concentração na qual a inibição da enzima é igual a 50 %.

Com relação ao padrão de O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato utilizado na avaliação da toxicidade, o mesmo foi sintetizado por uma rota sintética diferente da apresentada no item anterior. Como será discutido com mais detalhes adiante, a massa obtida na síntese descrita no item 1.1 deste capítulo foi suficiente apenas para a realização das caracterizações. O padrão dessa substância que foi usado no teste de neurotoxicidade foi sintetizado no Instituto de Química da UNICAMP pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda e foi gentilmente cedido para que os testes pudessem ser realizados.

Após o preparo das soluções descritas na Tabela 8, os valores de inibição da AChE para as mesmas foram determinados em triplicata utilizando as modificações propostas por Azevedo (2013) ao método de Ellman e colaboradores (1961). Os passos que foram realizados são descritos a seguir:

- Transferiu-se uma alíquota de 65,0 μL de solução tampão fosfato 0,200 mol L^{-1} pH 7,20 e de 10,0 μL da enzima AChE extraída de cérebro de ratos (Anexo 1) para 72 poços de uma placa de 96 poços.
- Adicionou-se 10,0 μL de acetona (controle) em 12 poços e 10,0 μL , em triplicata, das soluções descritas na Tabela 8, aos demais poços.
- Homogeneizou-se as soluções resultantes e incubou-se por 3 horas em banho maria (Kacil BM-02) a 37 °C.
- Após esse tempo, acrescentou-se 65,0 μL de solução 1,00 x 10⁻³ mol L^{-1} do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico - DTNB - (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,200 mol L^{-1} pH 7,20 e 65,0 μL de solução aquosa 1,00 x 10⁻³ mol L^{-1} de iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich).
- Determinou-se a absorvância em 405 nm no tempo inicial e a cada 60 segundos, durante 6 minutos, no leitor de placas ELX800 da Biotek.
- Calculou-se a variação média de absorvância por minuto para cada repetição do controle e para cada repetição das soluções apresentadas na Tabela 8 ($(\Delta_{abs} / \text{min})_{repetição}$).
- Determinou-se a variação média de absorvância por minuto para o controle ($(\Delta_{abs} / \text{min})_{controle}$) e, através da equação abaixo (Equação 1), chegou-se à

porcentagem de inibição para cada repetição das soluções apresentadas na Tabela 8.

Equação 1: Porcentagem de inibição

$$\% \text{ inibição} = \left[100 - \left(\frac{((\Delta_{abs} / \text{min})_{\text{repetição}} \times 100)}{(\Delta_{abs} / \text{min})_{\text{controle}}} \right) \right]$$

Uma vez determinados os valores de porcentagem de inibição da AChE para cada repetição das soluções, os valores de IC₅₀ (3 horas) da AChE para os compostos testados, nas condições usadas no presente trabalho, foram calculados com auxílio do programa *GhaphPad Prism 5* da *GhaphPad Software*.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Síntese e caracterização do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato

Diferentemente do esperado, a rota sintética utilizada, a qual se encontra resumida na Figura 10, levou também à formação do produto difosforilado com elevado rendimento. O seu rendimento foi de 47 %, enquanto que, o do produto almejado, O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato, produto monofosforilado, foi de apenas 6 %.

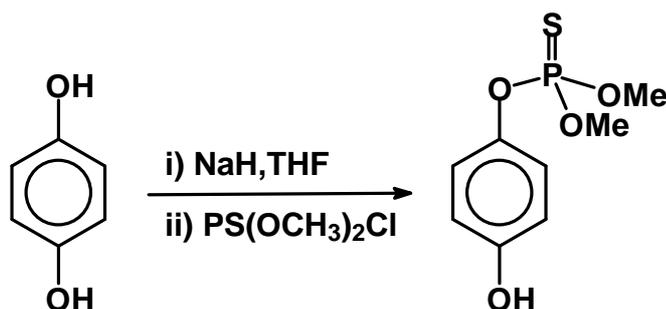


Figura 10: Esquema da rota utilizada para síntese do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato.

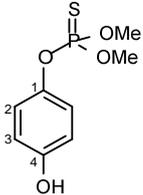
Nesse sentido, várias modificações visando aumentar o rendimento do produto almejado e diminuir o do produto difosforilado foram propostas à rota sintética descrita. Dentre elas, pode-se citar: a mudança da base utilizada para desprotonar a hidroquinona (ex. *n*-butil lítio, metil lítio, *tert*-butil lítio, hidróxido de sódio, piridina ao invés do hidreto de sódio), a mudança na proporção estequiométrica da síntese (ex.: 1:0,5:0,5 – hidroquinona:base:fosforilante ao invés de 1:1:1), dentre

outras. Porém, em nenhum caso, o rendimento de formação do produto almejado foi superior a 6 %. A formação com alto rendimento do produto difosforilado ocorreu porque, provavelmente, o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato é um ácido mais forte que a hidroquinona. Sendo assim, uma vez que ele era formado no meio reacional ele protonava a base conjugada da hidroquinona, favorecendo assim a segunda fosforilação e desfavorecendo a formação do produto monofosforilado.

Desta forma, como várias possibilidades foram testadas e não se conseguiu um rendimento alto do produto almejado, resolveu-se, após purificação do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato, avançar a sua caracterização, já que, a massa obtida, aproximadamente 20 mg, era suficiente para a realização desse procedimento.

Alguns dados extraídos do espectro de RMN de ^{13}C e ^1H (Anexos 2 e 3), o espectro de massas do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato sintetizado e, ainda, a interpretação do mesmo são mostrados na Tabela 9 e nas Figura 11 B e Figura 12, respectivamente. Esses resultados mostram que o produto almejado, mesmo com baixo rendimento, foi sintetizado com sucesso. Comparando-se ainda os espectros de massas do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato oriundo dos ensaios de degradação realizado por Araújo (2006) e da síntese realizada no presente trabalho, respectivamente, Figuras Figura 11 A e B, chega-se à conclusão que a proposta estrutural feita por Araújo (2006) estava correta.

Tabela 9: Dados dos espectros de RMN do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato sintetizado.

Estrutura	^1H -RMN δ , J(Hz), TMS	^{13}C -RMN δ , J(Hz), TMS
	7,02 (2H, d, 3J 6,8, H do C3); 6,78 (2H, d, 3J 6,8, H do C2); 3,84 (6H, d, 3J 13,7, 2 x OCH ₃); 2,30 (1H, H do OH)	153,4 (s, 4-C), 144,4 (d, 2J 7,7, 1-C), 122,1 (d, 3J 4,6, 2-C), 116,3 (s, 3-C) 55,4 (d, 2J 5,4, 2 x OCH ₃)

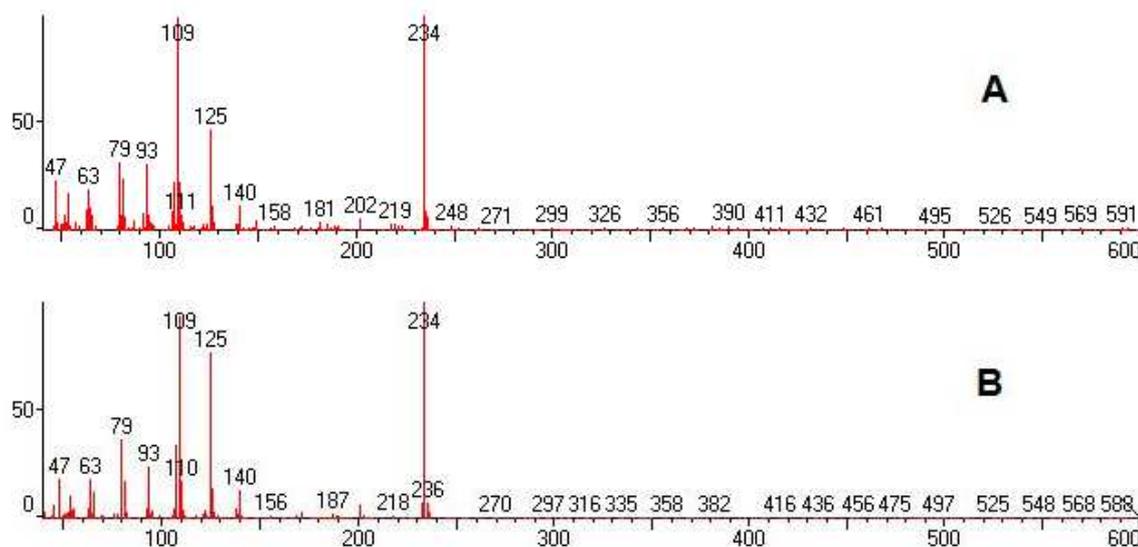


Figura 11 A e B: Espectros de massas (70 eV) do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato oriundo dos testes de degradação realizado por Araújo (2006) (A) e da rota sintética mostrada na Figura 10 (B).

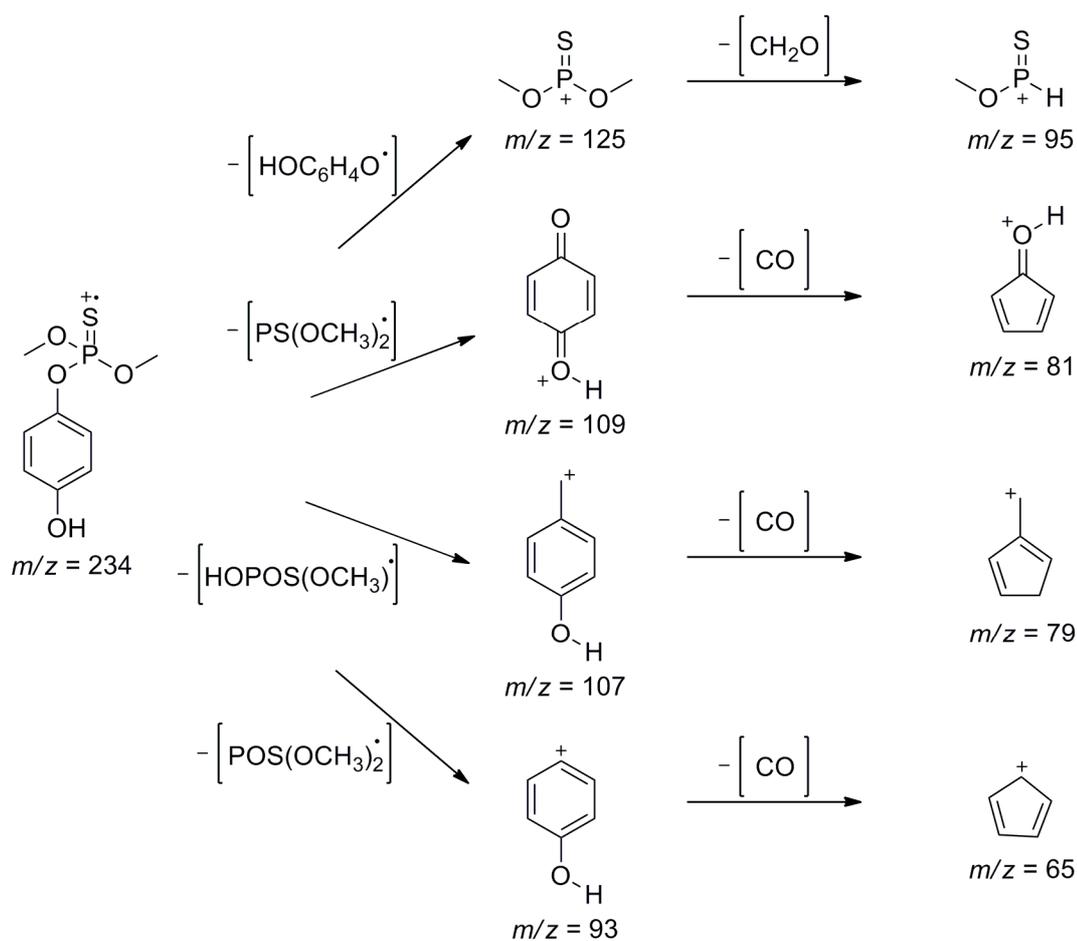


Figura 12: Propostas estruturais de alguns fragmentos presentes no espectro de massas do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato (Extraído de Araújo *et al.*, 2013).

Como já mencionado, o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato ainda não havia sido citado na literatura como um subproduto da degradação fotoquímica do paration metílico em matrizes aquosas. Desta forma, basicamente, a sua síntese, como descrita no item 1.1 deste capítulo, caracterização e uma proposta de formação do mesmo levou a publicação de um artigo de título *“Photochemical nitro-nitrite rearrangement in methyl parathion decay under tropical conditions”* na revista *“Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes”* em 2013 (Araujo *et al.*, 2013). No mesmo, sugere-se que esse produto foi formado via um rearranjo fotoquímico do grupo nitro do paration metílico, Figura 13. Esse rearranjo (nitro-nitrito) é um processo fotoquímico já citado na literatura para outros compostos (Chapman *et al.*, 1966).

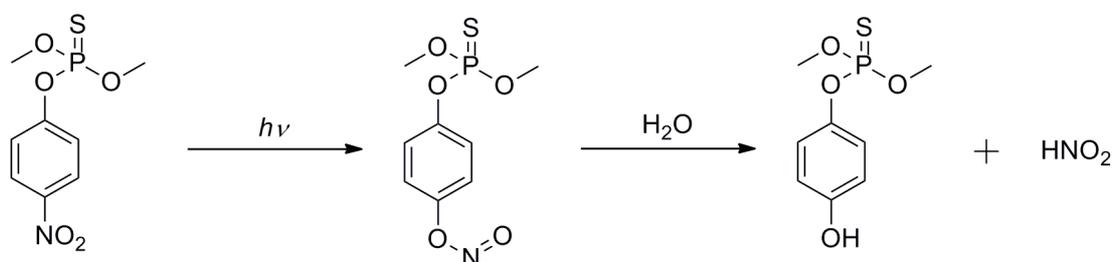


Figura 13: Proposta de conversão fotoquímica do paration metílico em O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato.

Embora, como já mencionado, a massa obtida do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato utilizando-se o procedimento descrito no item 1.1 não tenha sido suficiente para realizar o teste de neurotoxicidade, o mesmo foi sintetizado pelo grupo do professor Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda (UNICAMP) e foi gentilmente cedido para a sua realização.

2.2 Avaliação da toxicidade do paration metílico e de alguns dos seus subprodutos frente ao teste de inibição da AChE

A Figura 14 mostra a placa de 96 poços logo após a realização do teste de inibição da AChE para o paration metílico e demais subprodutos. Analisando-se a mesma, observa-se que, quando foram adicionadas soluções de paration metílico (PME) nas concentrações de 50,0; 100 e 400 mg L⁻¹ e de paraoxon metílico (POM) nas concentrações de 50,0; 100 e 400 µg L⁻¹, a intensidade da coloração amarela ao final do teste foi menor. Isso indica que houve maior inibição da enzima nesses

casos. Analisando-se ainda a Figura 14, observa-se que a intensidade da coloração amarela nos poços onde foram adicionados 10,0 μL de acetona (controle) é acentuada. Isso demonstra que esse volume de acetona, nas condições utilizadas no teste, não inibe de maneira significativa a AChE.

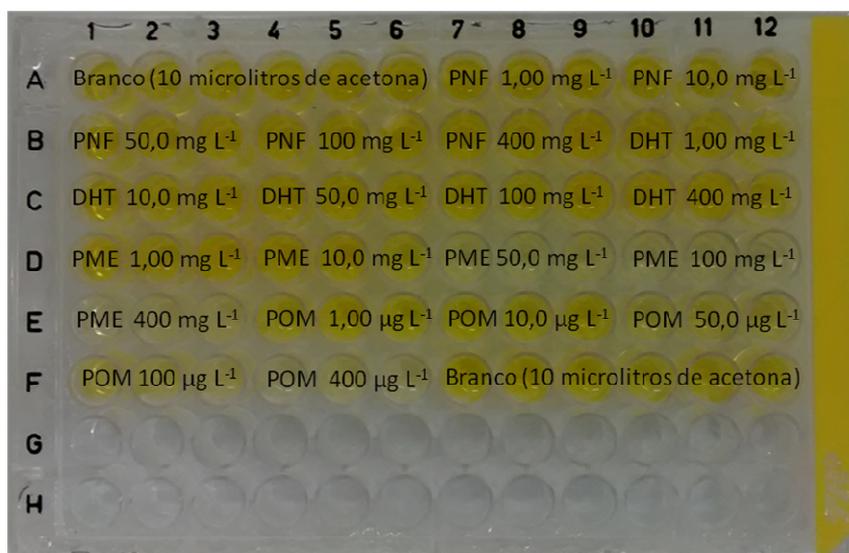


Figura 14: Placa de 96 poços logo após a realização do teste de inibição da AChE para o paration metílico e alguns dos seus subprodutos (PNF: *p*-nitrofenol; DHT: O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato; PME: paration metílico; POM: paraoxon metílico).

As suposições realizadas analisando-se a Figura 14 foram confirmadas quando se calculou, a partir dos valores de porcentagem de inibição obtidos (Anexo 4), o IC_{50} (3 horas) da AChE para o paration metílico e alguns dos seus subprodutos. Esses valores, bem como a estrutura dos compostos testados, são mostrados na Figura 15.

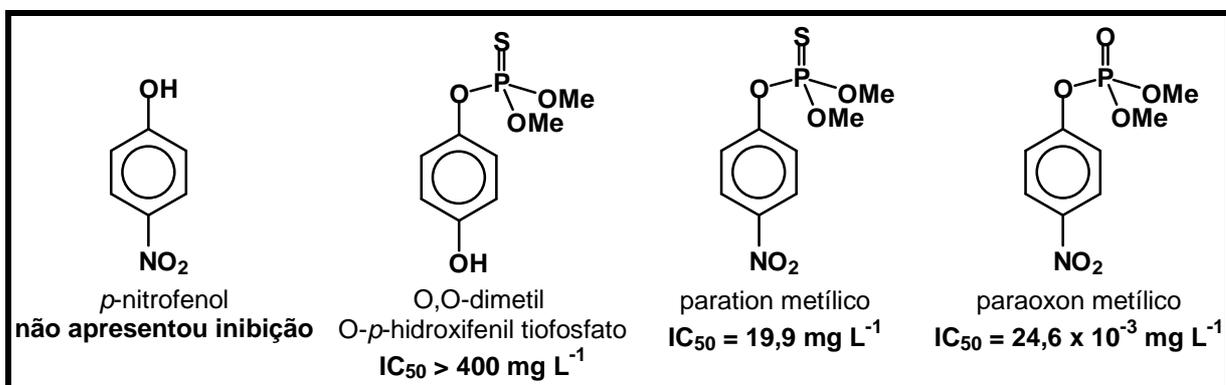


Figura 15: IC_{50} (3 horas) da AChE para o paration metílico e alguns dos seus subprodutos e a estrutura dos mesmos.

Analisando-se os resultados mostrados na Figura 15, chega-se às seguintes observações principais:

→ O *p*-nitrofenol, subproduto oriundo do processo de hidrólise do paration metílico ou do paraoxon metílico, não inibiu a AChE nas condições usadas no teste.

Esses resultados eram esperados, visto que, Dzyadevych e Chovelon (2002) e Čolović e colaboradores (2011) já haviam mostrado que o *p*-nitrofenol e o 2-hidroxi-3,5,6-tricloropiridina (produto da hidrólise do clorpirifós) não inibem a AChE. Esses resultados mostram que há uma relação entre a presença do átomo de fósforo pentavalente e a inibição da enzima AChE.

→ O paraoxon metílico é mais tóxico, frente ao teste de inibição da AChE, que o paration metílico.

Esse resultado também já era esperado, visto que, muitos autores citam ou comprovam que os produtos de degradação que possuem a ligação P=O são anticolinesterásicos mais potentes que os pesticidas originais que possuem a ligação P=S (Fukuto, 1990; Gälli *et al.*, 1994; Dzyadevych e Chovelon, 2002; Santos *et al.*, 2007; Čolović *et al.*, 2011; Patrick, 2013). Eles mencionam que isso acontece, principalmente, porque um dos passos cruciais para que ocorra a inibição da AChE pelo composto organofosforado é o ataque nucleofílico do oxigênio da serina, resíduo de aminoácido presente no sítio ativo da enzima, ao fósforo do composto. Desta forma, como o fósforo da ligação P=O possui densidade eletrônica menor que o fósforo da ligação P=S ele está mais susceptível ao ataque nucleofílico da serina. Ou seja, compostos com a ligação P=O inibem de forma mais eficiente a AChE do que seus análogos sulfurados com a ligação P=S.

→ O O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato é menos tóxico que o paration metílico frente ao teste de inibição da AChE.

Provavelmente esse resultado foi encontrado porque houve a troca do grupo nitro (retirador de elétrons) pelo grupo hidroxila (doador de elétrons) no processo de degradação que levou o paration metílico a O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato. Essa troca faz com que o fósforo do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato possua densidade eletrônica maior que o fósforo do paration metílico, o que pode ser visto com mais detalhes na Figura 16. Desta forma, ele está menos susceptível ao ataque

nucleofílico da serina, fazendo com que o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato seja um anticolinesterásico menos eficiente que o paration metílico.

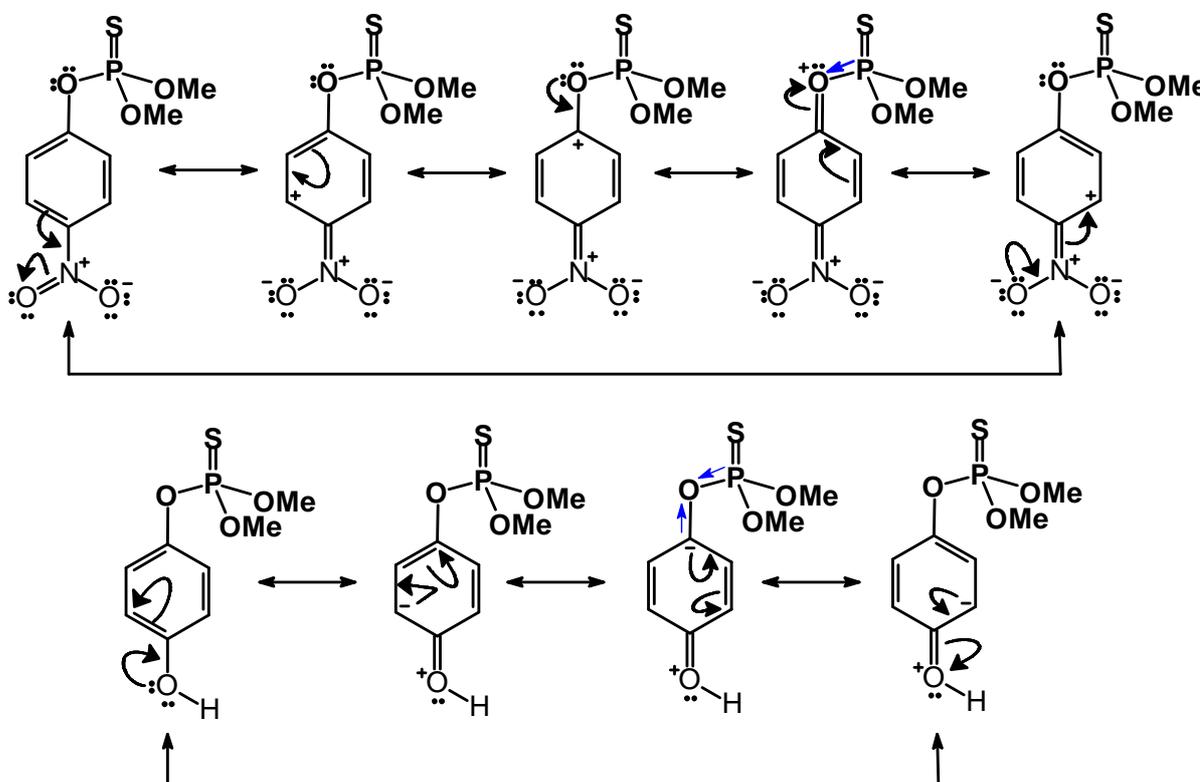


Figura 16: Algumas estruturas de ressonância do paration metílico e do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato.

Nesse sentido, Fukuto e Metcalf, em 1956, avaliando a toxicidade, através da determinação dos valores de IC_{50} da AChE, do paraoxon etílico e de diversos compostos que diferiam do mesmo apenas por mudanças no substituinte ligado ao anel aromático, chegaram à conclusões similares. Eles mostraram que, quando grupos retiradores de elétrons estavam ligados ao anel, principalmente, nas posições *orto* e *para*, a ação anticolinesterásica do composto era mais acentuada, enquanto que, quando os substituintes eram doadores de elétrons, a ação era menor. Para ilustrar o que foi dito, apresenta-se os resultados de IC_{50} da AChE encontrados pelos autores para o paraoxon etílico (O,O-dietil O-*p*-nitrofenil fosfato) e para o O,O-dietil O-*p*-metoxifenil fosfato, respectivamente, $2,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $> 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Ainda com relação à comparação entre a toxicidade do paration metílico e do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato, embora frente ao teste de inibição da AChE os

resultados tenham mostrado que o paration metílico é mais tóxico que o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato, pode ser que, utilizando-se outros testes, os resultados sejam diferentes. Nesse sentido, Dzyadevych e Chovelon (2002) e Aydin e colaboradores (2011) mostraram que, para o teste de toxicidade que utiliza a bactéria *Vibrio Fischeri*, o paration metílico é mais tóxico que o paraoxon metílico. Isso provavelmente acontece porque a ação tóxica dos compostos organofosforados nesse caso não se dá pela inibição da AChE (Dzyadevych e Chovelon, 2002; Aydin *et al.*, 2011; Eleršec e Filipič, 2011). Sendo assim, acredita-se que seja importante buscar colaborações para que se possa realizar testes de toxicidade para o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato, visando prever de forma mais adequada os impactos que uma possível formação do mesmo poderia ocasionar.

CAPÍTULO 3

DEGRADAÇÃO DO PARATION METÍLICO EM
ÁGUA ULTRAPURA COM E SEM ÁCIDOS
HÚMICOS: DADOS CINÉTICOS, DE
TOXICIDADE E ANÁLISE DO PARAOXON
METÍLICO

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias, resultados e discussões referentes ao teste de degradação do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos (Experimento 1 - degradação abiótica do paration metílico). Além da determinação de alguns dados cinéticos para a degradação do pesticida em estudo nessas matrizes, foram realizadas, também, ao longo desse experimento, a avaliação da neurotoxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE e a determinação da concentração do paraoxon metílico. A escolha de se analisar esse subproduto ao longo do experimento foi feita devido a sua alta toxicidade comparada ao pesticida original e aos outros subprodutos, como foi apresentado no capítulo 2. Neste capítulo, ainda são apresentadas as metodologias, resultados e discussões referentes à validação do método de análise utilizado para quantificar o paration metílico e o paraoxon metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos. Esse procedimento é extremamente necessário para que se possa ter confiança nos resultados gerados.

1. METODOLOGIA

1.1 Preparo da solução aquosa contendo ácidos húmicos

A solução aquosa, contendo ácidos húmicos (água ultrapura com ácidos húmicos), utilizada no presente trabalho foi preparada com base no protocolo da EPA para o teste de fotólise indireta (EPA, 2002). Resumidamente, foram adicionados 10,0 g de ácidos húmicos (Sigma-Aldrich) em 1 L de água ultrapura (Milli-Q plus/Millipore). Em seguida, a solução foi levada à exposição solar em erlenmeyer de 2 L (Pyrex) durante 4 dias. Após o período de exposição, foi retirado um volume de 6,00 mL para o preparo de 1 L de solução estoque de ácido húmico. Essa solução apresentou uma absorvância de 0,494 u.a. em 370 nm (célula de 1 cm) utilizando um espectrofotômetro UV-Vis da Varian (Cary-50Bio), sendo posteriormente guardada sob refrigeração. Antes de ser utilizada na validação do método de análise e no experimento 1, a solução estoque foi diluída 1:10 com tampão fosfato $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,00, gerando uma solução com absorvância aproximadamente igual a $5,00 \times 10^{-2}$ u.a. em 370 nm (célula de 1 cm).

A concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) dessa solução de ácidos húmicos foi feita pelo Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade

Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LCA/UENF). Para essas quantificações foi adicionado 5 μL de HCl 2 mol L^{-1} nas soluções e as medidas foram feitas no aparelho TOC 5000 (Shimadzu) com injetor automático ASI – 5000.

1.2 Método de análise utilizado para quantificar o paration metílico e o paraoxon metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos

O método de análise utilizado para quantificar o paration metílico e o paraoxon metílico em solução aquosa (água ultrapura - Milli-Q plus/Millipore) com e sem ácidos húmicos está baseado na extração/concentração dessas substâncias por intermédio da extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), técnica que vem sendo intensamente utilizada com essa finalidade (Castillo *et al.*, 1997; St-amand e Girard, 2004; Liu *et al.*, 2006; Druzina e Stegu, 2007), com posterior quantificação através da cromatografia gasosa.

Para a realização do processo de extração/concentração, foi utilizado um *manifold* da Agilent Technologies. Parte do aparato necessário para a execução do mesmo é mostrado na Figura 17.

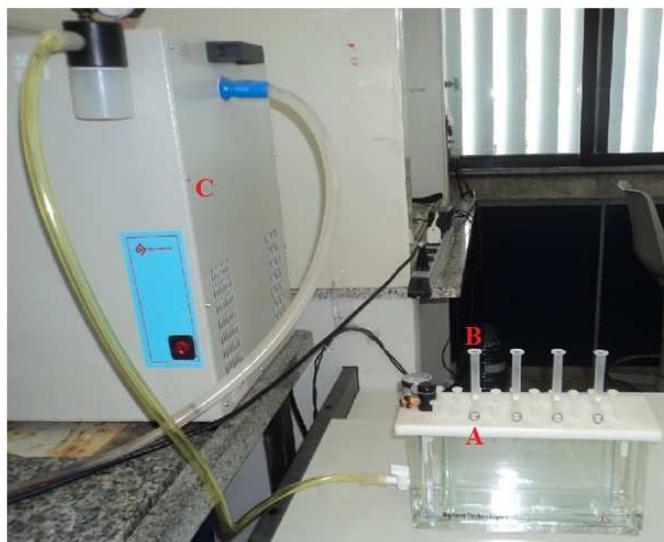


Figura 17: Aparato necessário para a realização da extração em fase sólida (A = *manifold* de extração; B = cartucho de extração; C = bomba à vácuo).

Os passos gerais do método de análise utilizado para quantificar as substâncias de interesse em solução aquosa com e sem ácidos húmicos encontram-se a seguir.

Processo de extração/concentração

1) Condicionou-se o cartucho de extração em fase sólida (SPE) passando-se 2 x 3,00 mL de metanol e 2 x 3,00 mL de água ultrapura pelo cartucho;

Na maior parte das análises realizadas, o cartucho utilizado foi o SampliQ OPT (60 mg/3 mL) da Agilent Technologies. Em alguns testes iniciais, onde foi escolhido o cartucho que seria utilizado ao longo dos testes de degradação, o cartucho Oasis HLB (500 mg/6 mL) da Waters também foi usado, sendo o seu condicionamento realizado de forma idêntica ao do SampliQ OPT.

2) Sem deixar o cartucho secar, passou-se 25,0 mL da solução contendo a(s) substância(s) a ser(em) analisada(s);

3) Secou-se ao máximo o cartucho, deixando as torneiras do *manifold* abertas, por 15 min, e a bomba à vácuo ligada (Quimis Q355J);

4) Eluiu-se com acetato de etila (Tedia Brasil, grau CG) (3 x 2,50 mL);

5) Adicionou-se uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (Vetec) ao tubo de ensaio;

6) Transferiu-se o conteúdo presente no tubo de ensaio para um balão de fundo redondo e lavou-se o mesmo com 2,50 mL de acetato de etila. Evaporou-se em sistema rota- evaporador/banho maria (Fisatom 802/550) até aproximadamente 0,50 mL;

7) Transferiu-se o volume presente no balão para um *vial* e evaporou-se até a secura com argônio (White Martins);

8) Adicionou-se 250 µL de acetato de etila ao *vial*;

Processo de injeção

9) Injetou-se 1,00 µL dos extratos² obtidos no cromatógrafo a gás acoplado ao detector de espectrometria de massas - sistema CG/EM (2010-Plus) da Shimadzu utilizando o método *SIM* (monitoramento de íon seletivo, do inglês *Selective Ion Monitoring*) para a detecção das substâncias. Alguns dos parâmetros cromatográficos que foram utilizados estão descritos nas Tabelas Tabela 10 e 11.

Processo de quantificação

10) Comparou-se a área obtida com a curva analítica adequada.

² A solução obtida após a realização do processo de extração/concentração será chamada de extrato.

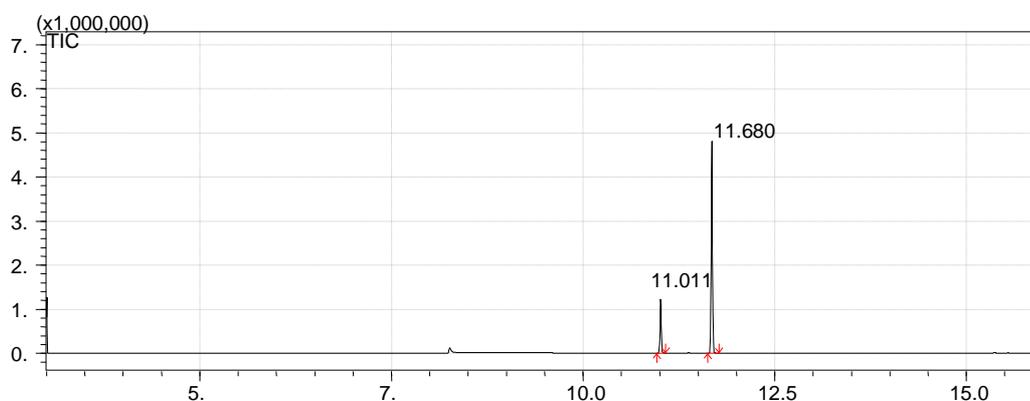
Tabela 10: Parâmetros cromatográficos que foram utilizados para a realização das análises.

Parâmetros	Valores ou especificações
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura da interface do detector	300 °C
Temperatura da fonte de íons	200 °C
Temperatura inicial do forno/tempo de permanência	120 °C/5,00 min
Taxa de aquecimento 1	15 °C/min até 240 °C
Taxa de aquecimento 2/ tempo de permanência na temperatura final	25 °C/min até 280 °C 1,40 min
Pressão constante	190 kPa
Coluna	VF-5MS Varian (30m, I.D. 0,25 mm, 0,25 µm)
Razão de split e volume de injeção	10 e 1 µL

Tabela 11: Íons (fragmentos) selecionados para análise de cada substância e para a corrida de maneira geral, tempos de retenção (t_r) encontrados e o tempo total da corrida.

Substâncias/corrída	Íons	Tempo (min)
Paraoxon metílico	247 e 109	11,011
Paration metílico	263 e 109	11,680
Tempo total da corrida	263, 247 e 109	16,000

O padrão para a escolha dos íons apresentados na Tabela 11 foi o de selecionar o íon molecular $[M]^+$ e o pico base para cada substância. Sendo os tempos de retenção obtidos através da injeção, utilizando-se os métodos cromatográficos descritos na Tabela 10 e o modo SCAN, de uma solução 100 ppm dos padrões em acetato de etila. O cromatograma obtido nesse procedimento pode ser visualizado na Figura 18.

**Figura 18:** Cromatograma obtido, no modo SCAN, a partir de solução em acetato de etila de paraoxon metílico e paration metílico nas concentrações de 100 ppm.

1.3 Validação do método de análise

Previamente a utilização do método de análise descrito no item anterior no teste de degradação, foi feita a validação do mesmo. Para esse processo foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, exatidão e precisão, linearidade, limite de quantificação e detecção. Todas essas determinações foram feitas baseadas no trabalho de Ribani e colaboradores (2004).

1.3.1 Determinação da seletividade, exatidão e precisão do método de análise

Somente para a solução contendo o pesticida e o paraoxon metílico em água ultrapura, a seletividade, exatidão e precisão do método de análise foram determinadas utilizando-se os dois cartuchos de extração em fase sólida citados: Oasis HLB (500 mg/6 mL) da Waters e o SampliQ OPT (60 mg/3 mL) da Agilent Technologies. Esse procedimento foi realizado para verificar qual deles seria mais adequado para ser utilizado nas demais etapas do presente trabalho. Adiante será discutido os motivos pelos quais o cartucho SampliQ OPT (60 mg/3 mL) da Agilent Technologies foi o escolhido.

A seletividade do método foi avaliada através do preparo de soluções aquosas com e sem ácidos húmicos contendo o paration metílico e o paraoxon metílico nas concentrações de $1,30 \text{ mg L}^{-1}$ e $30,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Posteriormente, utilizando-se essas soluções, foram realizados, em triplicata, os processos de extração/concentração e injeção descritos anteriormente, item 1.2 deste capítulo. Os cromatogramas resultantes dessas injeções foram comparados com os cromatogramas oriundos das injeções de extratos obtidos da mesma forma, porém, partindo-se de água ultrapura com ou sem ácidos húmicos e sem a adição das substâncias em estudo. Ou seja, partindo-se do branco.

Para avaliar a exatidão do método foi utilizado um ensaio de recuperação. Desta forma, foram preparadas cinco soluções contendo $32,5 \text{ } \mu\text{g}$ de paration metílico e $0,750 \text{ } \mu\text{g}$ de paraoxon metílico em $250 \text{ } \mu\text{L}$ de acetato de etila ("Soluções sem extração"). Um volume de $1,00 \text{ } \mu\text{L}$ dessas soluções foi injetado e uma média das áreas obtidas para cada substância foi determinada. Posteriormente, comparando-se esses valores (considerados como 100 % de recuperação) com as médias das

áreas obtidas a partir da injeção de cinco extratos provenientes da água ultrapura com e sem ácidos húmicos previamente fortificadas com 1,30 mg L⁻¹ de paration metílico e 30,0 µg L⁻¹ de paraoxon metílico, chegou-se às taxas de recuperação dessas substâncias nas matrizes e cartuchos utilizados.

A precisão do método de extração/concentração, para cada uma das substâncias de interesse, nas diferentes matrizes e cartuchos utilizados, foi expressa através dos intervalos de confiança da taxa de recuperação com 95% de probabilidade. Esses valores foram calculados utilizando-se a Equação 2.

Equação 2: Intervalo de confiança da média

$$\pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Sendo:

s: estimativa do desvio padrão das porcentagens de recuperação obtidas a partir de cinco extrações; **n:** número de repetições, no caso 5; **t_{n-1}:** valor crítico da distribuição de Student com n-1 graus de liberdade, no caso 4.

1.3.2 Linearidade do método de análise – curvas analíticas

Para o preparo das curvas analíticas, utilizou-se soluções aquosas com e sem ácidos húmicos contendo as seguintes concentrações de paration metílico: 1,30; 1,00; 0,700; 0,400 e 0,0500 mg L⁻¹ e de paraoxon metílico: 30,0; 15,0; 7,50; 3,75 e 0,0500 µg L⁻¹. Posteriormente, realizou-se, em triplicata, os processos de extração/concentração e injeção descritos no item 1.2 deste capítulo, sendo as áreas obtidas utilizadas para o preparo das curvas analíticas.

1.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise

Os limites de detecção e quantificação foram determinados utilizando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica. As equações que foram usadas para essas determinações (Equações 3 e 4) são mostradas a seguir.

Equação 3: Limite de detecção (LD)

$$LD = 3.3 \times \frac{s}{S}$$

Equação 4: Limite de quantificação (LQ)

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Sendo:

s: estimativa do desvio padrão do branco (obtido após as injeções dos extratos oriundos do branco); **S:** coeficiente angular da curva analítica (obtido após confecção das curvas analíticas).

1.4 Degradação abiótica do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos – experimento 1

1.4.1 Preparo e exposição das soluções à radiação solar

Para a realização do teste de degradação foram preparadas soluções aquosas com e sem ácidos húmicos contendo paration metílico (Pestanal – 99,8 %) na concentração aproximada de 1,30 mg L⁻¹. Essas soluções foram deixadas sob agitação por meia hora e depois desse tempo foram determinados os valores de pH (pHmetro de bancada – Micronal – B374) e da concentração de oxigênio dissolvido (medidor de oxigênio – Lutron – DO5510). Após esse procedimento, as soluções foram transferidas, sem “headspace”, para frascos de borossilicato de 40 mL da Weathon. Alguns desses frascos, antes da exposição à radiação solar, foram envolvidos (protegidos) com papel alumínio com o objetivo de se avaliar os processos de degradação não fotoassistidos (ex. hidrólise, termólise e reações redox que ocorrem na ausência de radiação). Desta forma, nesse experimento, a degradação do paration metílico foi avaliada em quatro condições. Um resumo das mesmas e, ainda, os prováveis processos que podem levar à degradação do pesticida em cada uma delas, encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Condições nas quais a degradação do paration metílico (PME) foi avaliada no experimento 1, siglas utilizadas e prováveis processos de degradação do pesticida em estudo nas mesmas.

Condições	Siglas	Processo(s) de degradação provável(veis)
PME em água ultrapura protegida com papel alumínio	APE	Hidrólise e termólise
PME em água ultrapura com AH protegida com papel alumínio	AHE	Hidrólise, termólise e reações não fotoassistidas mediadas pelos AH
PME em água ultrapura exposta diretamente à radiação solar	APC	Hidrólise, termólise e fotólise direta
PME em água ultrapura com AH exposta diretamente à radiação solar	AHC	Hidrólise, termólise, reações não fotoassistidas mediadas pelos AH, fotólise direta e indireta

A exposição das soluções à radiação solar foi feita no telhado do anexo do Centro de Ciência e Tecnologia (CCT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada no município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil, tendo as seguintes coordenadas geográficas: 41,2914° W e 21,7609° S. Os frascos contendo as soluções foram imersos em um grande banho de água (1000 L) segundo procedimento descrito por Araújo (2006) e Araújo e colaboradores (2007). A exposição das soluções ocorreu entre os dias 06/05/2013 a 17/07/2013, Figura 19.

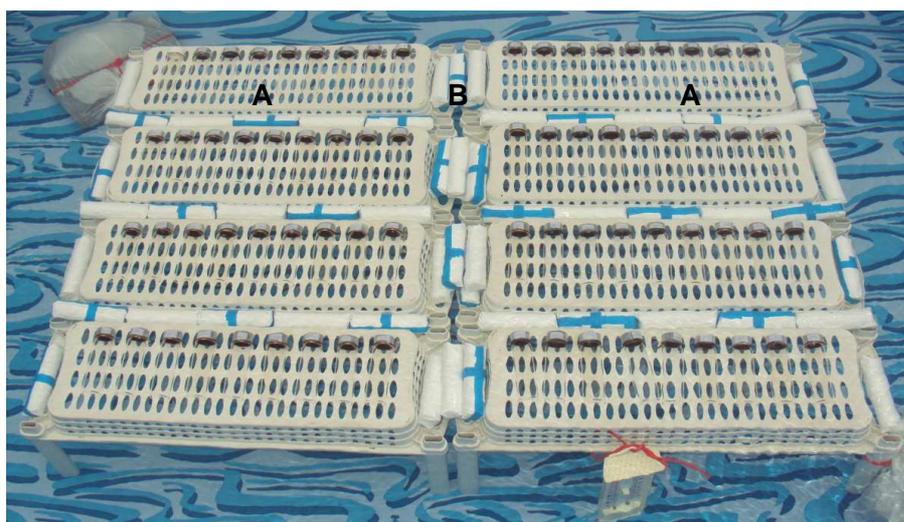


Figura 19: Frascos de borossilicato, contendo as soluções com paration metílico, expostos ao sol imersos em água no tempo inicial do experimento 1.

(A = Soluções expostas diretamente à radiação solar “Claro - C”; B = Soluções expostas à radiação solar envolvidas (protegidas) com papel alumínio “Escuro - E”)

Os frascos foram colocados no suporte e eram retirados para a realização das análises de forma aleatória, conseguida mediante sorteio. A temperatura da água onde os tubos foram imersos (temperatura interna) e da região próxima à exposição (temperatura externa) foram medidas ao longo dos dias de exposição com auxílio de termômetros analógicos de máxima e mínima temperatura da Incoterm (5201.03.0.00). A intensidade da radiação solar no período de realização do experimento foi obtida através de uma estação meteorológica localizada no município de Campos dos Goytacazes (RJ) mantida pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). As coordenadas geográficas da localização da mesma são: 41,3441° W e 21,7147° S, sendo as medidas feitas a uma altitude de 25,00 m. A medida da intensidade da radiação solar realizada pela estação é feita em intervalos de uma hora, o espectro utilizado para a medida é de 310 a 2800 nm e os dados são disponibilizados no site do INMET (<http://www.inmet.gov.br/portal/>).

1.4.2 Quantificação do paration metílico e do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 1

Para se avaliar a degradação do paration metílico e a possível formação e degradação do paraoxon metílico ao longo do experimento 1, foram realizadas quantificações no tempo inicial (quadruplicata) e após a exposição ao sol durante 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 31, 36, 48 e 72 dias. Para cada um dos dias mencionados, três frascos (triplicata) de cada uma das quatro condições avaliadas foram retirados para a realização das análises. Os processos utilizados para realizar a quantificação do paration metílico e do paraoxon metílico foram descritos no item 1.2 deste capítulo.

Nos mesmos dias que foram realizadas as quantificações do paration metílico e do paraoxon metílico, foram determinados os valores de inibição da AChE, em triplicata, para cada uma das condições avaliadas no experimento. O procedimento descrito no item 1.2 do capítulo 2 foi o utilizado para essas determinações. Um volume de 10,0 µL das soluções aquosas oriundas do ensaio de degradação foi o utilizado nos testes e o controle foi feito, em sextuplicata, utilizando-se 10,0 µL das respectivas matrizes aquosas (água ultrapura com e sem ácidos húmicos) usadas no preparo das soluções iniciais de paration metílico.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Validação do método de análise

2.1.1 Seletividade, exatidão e precisão do método de análise

Antes que esses resultados sejam apresentados é importante mencionar que, a quantificação do paration metílico foi feita utilizando-se a integração do cromatograma denominado de íons totais (TIC, do inglês *Total Ion Chromatogram*), enquanto que, a do paraoxon metílico foi realizada através da área do pico dessa substância no cromatograma do íon 109.

Uma vez feita essa observação, mostra-se nas Figura 20 A e B que o método proposto se mostrou seletivo para a análise do paration metílico (Figura 20 A) e do paraoxon metílico (Figura 20 B), já que, não houve substâncias que, após a realização do processo de extração/concentração e injeção utilizando a água ultrapura com e sem ácidos húmicos (branco), apresentassem o mesmo tempo de retenção desses compostos.

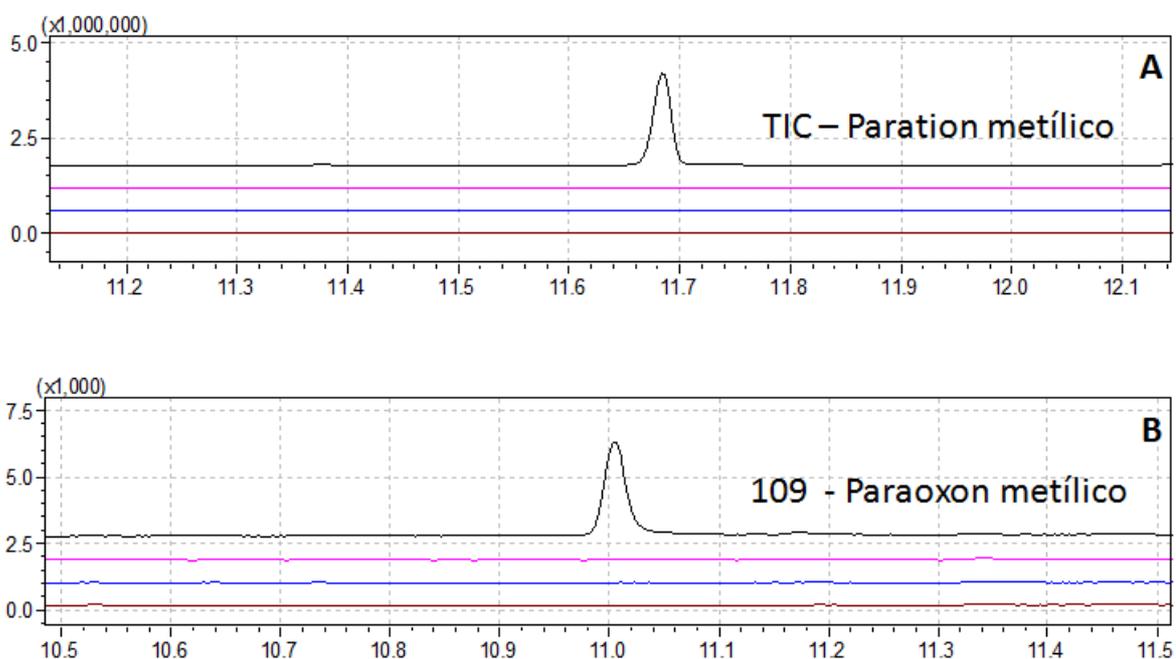


Figura 20 A e B: Comparação de cromatogramas obtidos a partir dos brancos de diferentes matrizes extraídos com diferentes cartuchos (linha rosa = água ultrapura/Oasis HLB; linha azul = água ultrapura/SampliQ OPT; linha marrom = água ultrapura com ácidos húmicos/SampliQ OPT) com um cromatograma obtido a partir do ponto mais concentrado da curva analítica (linha preta) do paration metílico (A) e do paraoxon metílico (B).

Ainda com relação à avaliação da seletividade, vale ressaltar que, a todo o momento ela era revalidada. Ou seja, durante os testes de degradação foi sempre observado se não havia outra substância que apresentasse o mesmo tempo de retenção das substâncias de interesse. Em anexo (Anexos 5, 6, 7 e 8) são apresentados alguns cromatogramas que ajudam a mostrar que o método desenvolvido foi seletivo também durante os testes de degradação.

Antes que os resultados obtidos para a avaliação da exatidão e precisão do método de análise sejam apresentados e discutidos é importante mencionar que, os cartuchos Oasis HLB (500 mg/6 mL) da Waters e o SampliQ OPT (60 mg/3 mL) Agilent Technologies foram os escolhidos para serem inicialmente testados, pois possuem sorbentes baseados em copolímeros obtidos a partir do divinilbenzeno e de substâncias contendo o grupo amida. A estrutura do copolímero presente no Oasis HLB, por exemplo, é mostrada na Figura 21. Já com relação ao presente no SampliQ OPT, não se encontram muitos detalhes a respeito da sua estrutura, já que, a sua patente está vigente. No catálogo da Agilent (Agilent, 2008), encontram-se as informações que se trata de uma poliamida e que possui a estrutura mostrada na Figura 22. Porém, mesmo que não seja diretamente mencionado no catálogo, acredita-se que a sua estrutura apresente anéis benzênicos, uma vez que a maioria dos sorbentes de fase polimérica possuem esses anéis em sua estrutura.

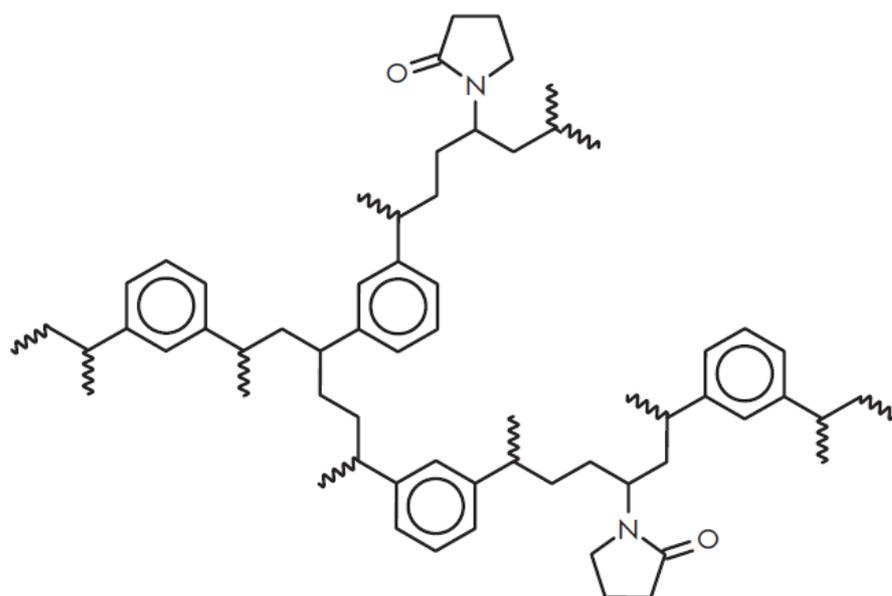


Figura 21: Copolímero (poli(divinilbenzeno-co-*N*-vinilpirrolidona) presente no cartucho Oasis HLB (500 mg/6 mL) da Waters. Adaptado de Waters (2003).

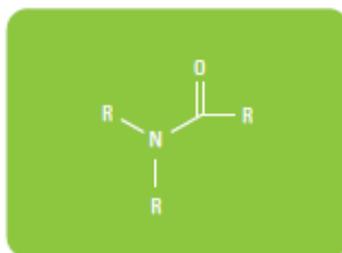


Figura 22: Estrutura do polímero presente no cartucho SampliQ OPT (60 mg/3 mL) da Agilent Technologies. Retirado de Agilent (2008).

Esses sorbentes ou alguns similares são citados na literatura (Castillo *et al.*, 1997; St-Amand e Girard, 2004; Liu *et al.*, 2006) e pelos fabricantes como adequados para realizar a extração de compostos que apresentam larga faixa de polaridade, sendo extremamente indicados para utilização na extração de compostos de média polaridade, tais como o paration metílico e o paraoxon metílico. Castillo e colaboradores (1997), por exemplo, mostraram que sorbentes de fase polimérica baseados em copolímeros de estireno-divinilbenzeno são mais adequados para realizar as extrações do paration metílico e do paraoxon metílico do que o de fase quimicamente ligada C-18. Na Tabela 13, encontram-se alguns resultados apresentados por esses autores.

Tabela 13: Taxas de recuperação, determinadas por Castillo e colaboradores (1997), para o paration metílico (PME) e paraoxon metílico (POM) em água subterrânea fortificada com os mesmos na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando-se diferentes sorbentes para extração em fase sólida.

Sorbente	Nome/Marca	Recuperação % (SD) ^a	
		PME	POM
C-18	Disco Empore C18 da 3M	70(10)	54(10)
Copolímero estireno-divinilbenzeno	Cartucho LiChrolut EN 200 mg/6 mL da Merck	90(13)	82(11)
Copolímero estireno-divinilbenzeno contendo grupos $-\text{SO}_3\text{H}$	Disco Empore SDB-PRS da 3M	96(13)	62(15)

^aEstimativa do desvio padrão para triplicata (SD, do inglês *standard deviation*).

Desta forma, já se esperava bons resultados na taxa de recuperação das substâncias de interesse utilizando-se os dois cartuchos de extração em fase sólida testados, o que foi confirmado com os resultados obtidos (Figura 23).

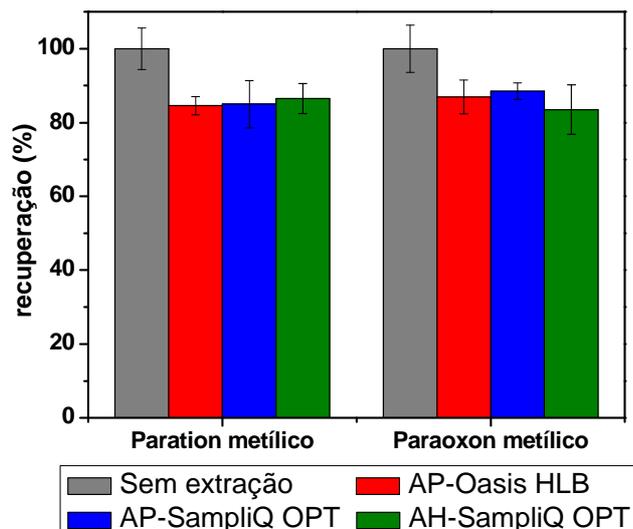


Figura 23: Taxas de recuperação do paration metílico e do paraoxon metílico em água ultrapura (AP) e em solução contendo ácidos húmicos (AH) utilizando-se os dois cartuchos de SPE (SampliQ OPT e Oasis HLB) para a solução em água ultrapura e apenas o SampliQ OPT para a solução contendo ácidos húmicos.

(As barras de erro apresentadas se referem aos limites de confiança da média com 95 % de probabilidade ($n=5$; $t_{student}=2,78$))

Analisando-se a Figura 23, observa-se inicialmente que, as taxas de recuperação obtidas para extração das substâncias de interesse em água ultrapura utilizando os dois cartuchos, Oasis HLB e o SampliQ OPT, foram estatisticamente idênticas. Para o paration metílico, os valores encontrados foram de $85,0 \pm 6,4$ % e $84,6 \pm 2,54$ %, enquanto que, para o paraoxon metílico foram de $88,5 \pm 2,3$ % e $86,9 \pm 4,6$ %, para os cartuchos SampliQ OPT e Oasis HLB, respectivamente. Segundo a Associação do Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas – GARP (1999) taxas de recuperação entre 70 e 120 % com precisão de ± 20 % são aceitáveis para a realização da análise de pesticidas. Além disso, Castillo e colaboradores (1997) e Druzina e Stegu (2007), trabalhando com a degradação de pesticidas organofosforados, utilizaram, respectivamente, métodos de análise com taxas de recuperação variando de 79-105 % e 80-110 % com estimativas do desvio padrão de até 13 % e 30 %. Sendo assim, avaliando-se a exatidão e a precisão que foram obtidas utilizando-se os dois cartuchos de SPE, chega-se à conclusão que ambos poderiam ser utilizados no decorrer do estudo. Porém, o custo de um cartucho Oasis HLB (500 mg/6 mL) da Waters em 2010, ano no qual esses cartuchos começaram a ser comprados, era de R\$ 36,00 e o de um cartucho SampliQ OPT (60 mg/3 mL) da Agilent Technologies era de R\$ 6,50. Desta forma,

por questões de custo, optou-se por utilizar o SampliQ OPT no decorrer do estudo. Essa escolha representou uma economia de aproximadamente R\$ 15.000, uma vez que, estima-se que foram realizadas, no total, 500 extrações no presente trabalho.

Ainda analisando a Figura 23, observa-se que as taxas de recuperação obtidas para a extração do paration metílico e do paraoxon metílico em água ultrapura contendo ácidos húmicos, procedimento o qual já foi realizado após a escolha do cartucho SampliQ OPT, também são adequadas para serem utilizadas no teste de degradação. Para o paration metílico, o valor encontrado foi de $86,5 \pm 4,1$ %, enquanto que, para o paraoxon metílico foi de $83,5 \pm 6,7$ %.

2.1.2 Linearidade do método de análise – curvas analíticas

Após as avaliações da seletividade, exatidão e precisão do método de análise, a etapa seguinte foi verificar a linearidade do método na faixa de interesse. Os parâmetros das curvas analíticas que foram preparadas para esta etapa do trabalho são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros das curvas analíticas do paration metílico (1,30; 1,00; 0,700; 0,400 e 0,0500 mg L⁻¹) e do paraoxon metílico (30,0; 15,0; 7,50; 3,75 e 0,0500 µg L⁻¹) em água ultrapura e em solução contendo ácidos húmicos.

Substância/Matriz	Água ultrapura		Solução contendo AH	
	Equação da reta	r	Equação da reta	r
Paration metílico	2,21E+06 X + 3,45E+04	0,996	2,16E+06 X - 9,21E+04	0,994
Paraoxon metílico	1,52E+02 X + 1,30E+02	0,997	1,51E+02 X + 1,30E+02	0,996

Analisando-se a Tabela 14, observa-se que os valores de coeficiente de correlação (r) encontrados foram elevados (>0,994) mostrando um ajuste bastante adequado dos dados ao modelo matemático de regressão linear. Os valores de r encontrados são julgados adequados tanto pelo INMETRO (INMETRO, 2003), o qual preconiza valores de r acima de 0,90, como pela ANVISA (ANVISA, 2003), a qual indica valores superiores a 0,99. Além disso, trabalhos que avaliam a degradação de pesticidas organofosforados em diversas matrizes aquosas (Castillo *et al.*, 1997; Druzina e Stegu, 2007) usam métodos que possuem valores de coeficiente de correlação superiores a 0,98, ou seja, valores próximos aos utilizados no presente estudo. Desta forma, as curvas analíticas preparadas foram julgadas adequadas para serem utilizadas no teste de degradação.

2.1.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise, em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos para determinação do paration metílico (PME) e do paraoxon metílico (POM) em água ultrapura com e sem ácidos húmicos são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise, em $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos para determinação do paration metílico (PME) e do paraoxon metílico (POM) em água ultrapura com e sem ácidos húmicos.

Substância/ Matriz	Água ultrapura ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Água ultrapura com AH ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	¹ S	² s	LD	LQ	¹ S	² s	LD	LQ
PME	2,21E+06	23,71	0,0354	0,107	2,16E+06	31,06	0,0474	0,144
POM	1,52E+02	0,550	0,0119	0,0360	1,51E+02	0,710	0,0156	0,0474

¹S: coeficiente angular da curva analítica (obtido após confecção das curvas analíticas); ²s: estimativa do desvio padrão do branco (obtido após as injeções dos cinco extratos oriundos do branco).

Analisando-se os valores apresentados na Tabela 15, observa-se inicialmente que eles são maiores que os encontrados por alguns autores que visam detectar pesticidas organofosforados em ambientes aquáticos naturais. Azevedo e colaboradores (2000), por exemplo, chegaram ao limite de detecção de $0,0100 \mu\text{g L}^{-1}$ para o paration metílico. Ou seja, valor aproximadamente 4 vezes menor que os encontrados no presente estudo. Isso ocorre principalmente porque nesses trabalhos são utilizados grandes volumes de água para realizar o procedimento de extração/concentração, geralmente 1 L, o que faz com que os limites de detecção e quantificação obtidos sejam menores. Nesse sentido, vale ressaltar que, no presente estudo, não seria possível realizar a extração/concentração com esse volume, uma vez que, grandes volumes de soluções teriam que ser expostos ao sol. Desta forma, optou-se por trabalhar com a concentração inicial de paration metílico nas soluções iniciais em aproximadamente $1,30 \text{ mg L}^{-1}$, ou seja, na faixa de ppm. Trabalhar com essa concentração permitiu que a degradação do paration metílico fosse acompanhada de maneira adequada e, principalmente, possibilitou que o paraoxon metílico fosse detectado e quantificado ao longo do teste de degradação. Caso fosse utilizada concentração inicial de paration metílico menor, provavelmente, não teria sido possível quantificar, com o método proposto, o paraoxon metílico, já que, como será visto, possivelmente, ele

teria sido formado em concentrações abaixo de $0,0400 \mu\text{g L}^{-1}$ (LQ aproximado para essa substância no método proposto).

2.2 Degradação do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos – experimento 1

2.2.1 Considerações iniciais sobre o teste de degradação e a exposição das soluções à radiação solar no experimento 1

Neste trabalho, almejou-se avaliar a degradação do paration metílico de forma mais próxima ao que ocorre em ambientes aquáticos naturais. Para que isso se torne possível, acredita-se que seja importante a adoção de alguns procedimentos. Desta forma, abaixo, os mesmos são expostos e, caso não tenham sido seguidos, serão apresentadas as justificativas.

- Trabalhar com águas naturais ao invés de somente soluções preparadas a partir de água ultrapura ou similares. Embora no experimento 1, devido a objetivos específicos, tenha sido usado esse tipo de solução, no experimento 2 utilizou-se água natural nos testes.

- Utilizar como fonte de radiação o sol ao invés de apenas lâmpadas, visto que, não há lâmpadas que possuam espectro de emissão idêntico ao da radiação solar que chega à superfície terrestre. Nesse sentido, utilizou-se luz solar como fonte de radiação no presente trabalho.

- Trabalhar com baixas concentrações da substância a ser estudada, ppb ou ppt, uma vez que, como visto no capítulo 1, são nessas concentrações que as mesmas são encontradas em água naturais.

Com relação a esse procedimento, como já discutido, não foi possível no presente trabalho, pois se almejava também quantificar o paraoxon metílico. Desta forma, trabalhou-se com o paration metílico na concentração inicial de $1,30 \text{ mg L}^{-1}$ para que o paraoxon metílico fosse formado na faixa de ppb (Zoh *et al.*, 2006) e, assim, pudesse ser quantificado pelo método analítico proposto. Por motivos similares, muitos pesquisadores (Sakellarides *et al.*, 2003; Zoh *et al.*, 2006; Druzina e Stegu, 2007; Weber *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2013) também optaram por iniciar os

testes de degradação com a concentração de paration metílico na faixa de ppm, entre 1,00 e 88,0 mg L⁻¹.

- Utilizar frascos de quartzo, para evitar que parte da radiação solar seja absorvida indevidamente antes de chegar à solução.

Com relação à realização desse procedimento, embora aconselhável, não é comum nos trabalhos da área e também não foi realizado no presente estudo. A maioria dos pesquisadores que avaliam a degradação de pesticidas organofosforados em matrizes aquosas sob ação da radiação solar usam tubos de borossilicato (Lartiges e Garrigues, 1995; Castillo *et al.*, 1997; Mansour *et al.*, 1997; Sakellarides *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2007 e 2013) ao invés de tubos de quartzo. Essa opção é feita principalmente devido ao menor custo dos frascos de borossilicato em relação aos de quartzo. Além disso, muitos desses autores mencionam que o vidro de borossilicato não provoca grandes atenuações à radiação solar que chega à superfície da terra ($\lambda > 290$). Porém, observa-se na Figura 24, na qual se encontra, dentre outros, o espectro UV-Vis no modo de transmitância para o frasco de borossilicato utilizado nos experimentos, que em 300 nm o mesmo absorve 50 % da radiação. Esses dados mostram que se realiza uma aproximação da realidade quando se utiliza frascos de borossilicato nos testes. Porém, acredita-se que essa aproximação é passível de ser utilizada, desde que, seja exposta no trabalho a atenuação da radiação que é ocasionada pelo tubo utilizado. Esse procedimento é realizado por alguns pesquisadores (Vialaton e Richard, 2002; Araujo *et al.*, 2007 e 2013) e é importante para que se possa comparar os resultados provenientes de diferentes estudos de forma mais adequada.

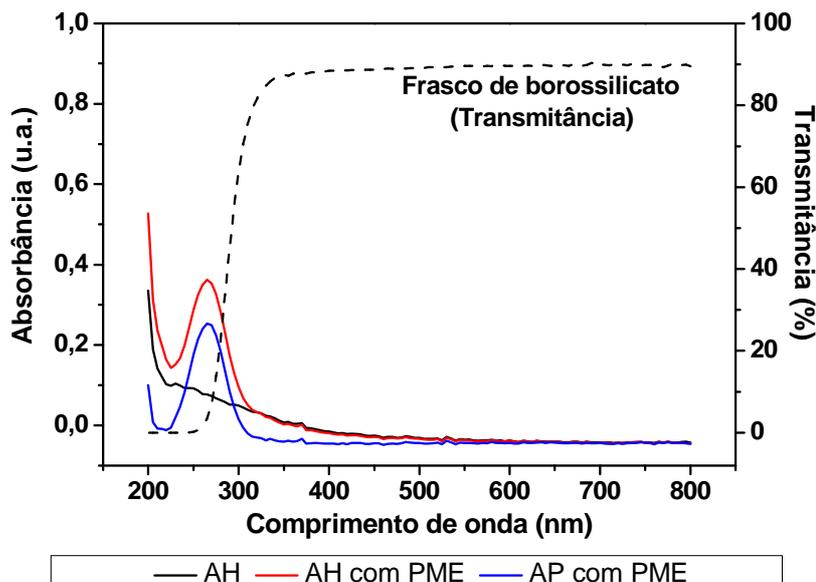


Figura 24: Espectros UV-Vis obtidos **no modo de absorbância** para a água ultrapura com ácidos húmicos (AH), para a água ultrapura com e sem ácidos húmicos fortificadas com paration metílico (AH com PME e AP com PME, respectivamente) e **no modo de transmitância** para o frasco de borossilicato utilizado no presente trabalho.

- E ainda, realizar o controle da temperatura para que as soluções não experimentem temperaturas muito elevadas, uma vez que, essas condições não são comuns aos ambientes aquáticos naturais.

Esse procedimento foi realizado no presente trabalho e, vale ressaltar que, poucos pesquisadores que trabalham com a degradação de pesticidas organofosforados em matrizes aquosas sob ação da radiação solar se preocupam em fazê-la. Acredita-se que esse procedimento seja de extrema importância, principalmente quando os experimentos são realizados em períodos muito quentes e de radiação solar com elevada intensidade. Como geralmente os volumes dos frascos onde as soluções são expostas ao sol são pequenos, caso não haja o controle da temperatura, a solução pode chegar à temperatura bastante elevada, o que não é comum em águas naturais.

No caso do presente trabalho, assim como feito por Araújo (2006) e Araújo e colaboradores (2007 e 2013), foi utilizado um grande banho de água visando controlar a temperatura ao longo do teste de degradação. Como pode ser observado na Tabela 16, a qual apresenta também algumas condições climáticas do período de realização do experimento 1, a temperatura máxima média alcançada pelo banho utilizado, 27 °C, é bem menor que a temperatura máxima média determinada

externamente, 39 °C. Além disso, observa-se que a variação da temperatura do banho ao longo do experimento 1, aproximadamente 8 °C, é bem menor que a variação da temperatura externa, aproximadamente 22 °C. Desta forma, como muito provavelmente as temperaturas experimentadas pelas soluções contendo o pesticida ao longo do experimento 1 são similares as determinadas para o banho, a sua utilização foi eficaz para que se tivesse condições mais próximas as encontradas em ambientes aquáticos naturais de regiões tropicais. Nesses ambientes, como já mencionado, não é comum que se observe altas temperaturas e grandes variações de temperatura ao longo do dia, já que, os mesmos, geralmente, são compostos por grandes volumes de água, substância que apresenta alto calor específico.

Tabela 16: Médias da intensidade da radiação e das temperaturas máximas e mínimas do ambiente e do banho com suas respectivas estimativas do desvio padrão, entre parênteses, no período no qual o experimento 1 foi realizado.

Período	Média da temperatura mín. e máx. (°C)		Radiação - W m ⁻²	
	^a Interna	^b Externa	24 h	10:00 às 20:00 ^c
06/05 a 17/07/2013	19 (1)	17 (2)	143	313
outono/inverno	27 (2)	39 (2)	(214)	(93)

^atermômetro colocado dentro do banho de água; ^btermômetro colocado fora do banho de água, mas próximo ao mesmo; ^cTempo Universal Coordenado (UTC, do inglês *Universal Time Coordinated*) o que equivale no Brasil ao intervalo de 7:00 às 17:00 (horário normal) e de 8:00 às 18:00 (horário de verão).

A utilização do banho para o controle de temperatura torna-se ainda mais importante quando se avalia os dados mostrados na Tabela 17. Na mesma encontram-se alguns resultados obtidos por Lartiges e Garrigues (1995) e Druzina e Stegu (2007) para a degradação do paration metílico em soluções que foram mantidas no escuro, porém em diferentes temperaturas. Analisando-a, observa-se que os processos de degradação não fotoassistidos (entre eles a hidrólise) são extremamente dependentes da temperatura.

Tabela 17: Tempos de meia-vida presentes na literatura para a degradação do paration metílico em diversas matrizes aquosas deixadas no escuro em diferentes temperaturas.

Matriz	Tempos de meia-vida e temperaturas		Referência
	6 °C	22 °C	
Água ultrapura	237 dias	46 dias	Lartiges e Garrigues (1995)
Água de rio	95 dias	23 dias	
Água de oceano	233 dias	30 dias	
	4 °C	25 °C	
Água subterrânea	Estável	47 dias	Druzina e Stegu (2007)
Água de rio	124 dias	18 dias	

2.2.2 Resultados cinéticos da degradação do paration metílico no experimento 1

Os resultados obtidos para a degradação do paration metílico no experimento 1 são apresentados na Figura 25 e na Tabela 18. Alguns cromatogramas referentes a esse estudo também podem ser visualizados nos anexos 5 e 6.

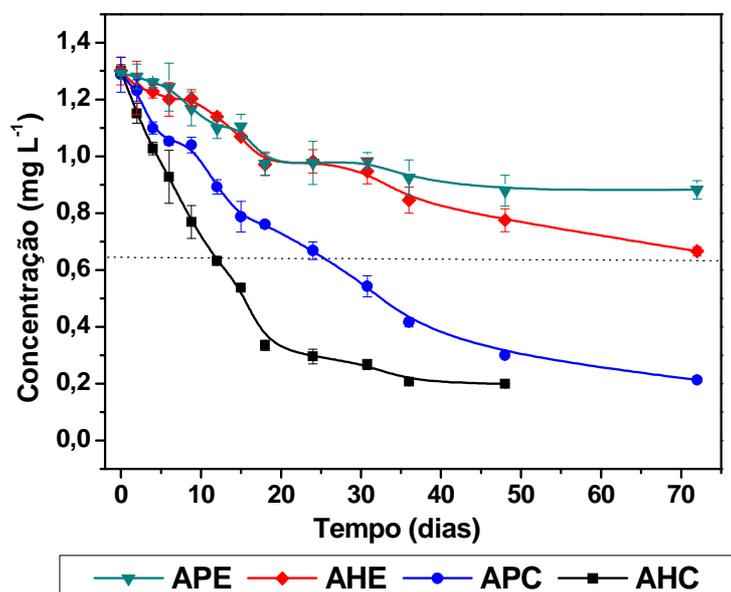


Figura 25: Degradação do paration metílico em água ultrapura com e sem ácidos húmicos expostas diretamente (AHC e APC) ou protegidas com papel alumínio (AHE e APE) à radiação solar.

(As barras de erro representam a estimativa do desvio padrão para triplicata)

Tabela 18: pH inicial das soluções utilizadas no experimento 1 e dados cinéticos determinados para a degradação do paration metílico nas diferentes condições testadas considerando-se um modelo cinético de 1ª ordem. (k = constante de velocidade e $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida)

Condições	pH inicial da solução	^a k (dias ⁻¹)	^b $t_{1/2}$ (dias)	^a R^2
APE	6,71	$6,28 \times 10^{-3}$	110	0,81
AHE	6,99	$9,59 \times 10^{-3}$	72	0,96
APC	6,71	$2,66 \times 10^{-2}$	26	0,98
AHC	6,99	$4,38 \times 10^{-2}$	16	0,91

^aDados obtidos através da curva: $\ln [C]/[C_0]$ versus tempo, onde o coeficiente angular é $-k$ e o r^2 é o coeficiente de correlação ao quadrado; ^bDeterminado através da equação: ($t_{1/2} = \ln 2/k$).

Os resultados cinéticos mostrados na Tabela 18 foram determinados considerando-se um modelo de 1ª ordem. Essa consideração foi feita, pois, dentre os modelos testados (ordem zero, primeira e segunda ordem), o modelo cinético de primeira ordem mostrou-se mais apropriado. Utilizando-o, os coeficientes de correlação ao quadrado (r^2) determinados foram elevados (0,81 a 0,98).

Realizando-se uma análise inicial dos resultados mostrados na Figura 25 e Tabela 18, observa-se que quando as soluções contendo o pesticida são expostas diretamente a radiação solar, AHC e APC, os menores tempos de meia-vida são encontrados, 16 e 26 dias, respectivamente. Enquanto que, quando elas são expostas envolvidas com papel alumínio, AHE e APE, os maiores tempos de meia-vida são encontrados, 72 e 110 dias, respectivamente. Esses resultados mostram que a radiação solar possui papel importante na degradação do paration metílico.

Outra observação que indica que a radiação solar, através das reações fotoquímicas, desempenha importante papel na degradação do paration metílico é a diminuição linear da sua concentração ao longo do tempo até o 18º e 36º dias de exposição direta ao sol para as soluções com (AHC) e sem ácidos húmicos (ADC), respectivamente. Testando-se um modelo cinético de ordem zero, característico de reações fotoquímicas, nesses períodos, chega-se a valores de coeficientes de correlação ao quadrado (r^2) iguais a 0,99 e 0,97, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sakellarides e colaboradores (2003) quando os mesmos avaliaram a degradação do paration metílico em água

destilada. Eles mostraram que a degradação do paration metílico é mais rápida quando as soluções são expostas diretamente a radiação solar.

Observa-se ainda, analisando a Figura 25 e a Tabela 18, que, a presença de ácidos húmicos, acelera a degradação do paration metílico, visto que, menores tempos de meia-vida foram encontrados para a degradação dessa substância nas soluções contendo ácidos húmicos (AHE: 72 dias e AHC: 16 dias) em comparação com os que foram encontrados nas soluções preparadas em água ultrapura (APE: 110 dias e APC: 26 dias). No caso da solução exposta ao sol, protegida com papel alumínio (AHE), os ácidos húmicos provavelmente aceleraram a degradação do pesticida via reações redox não fotoassistidas. Wolfe e colaboradores (1990) e Mansour e colaboradores (1999) descrevem que a matéria orgânica pode acelerar a degradação de pesticidas via reações redox não fotoassistidas. Quando a solução foi exposta diretamente a radiação solar (AHC), além das reações redox não-fotoassistidas, o processo de fotólise indireta provavelmente aumentou a taxa de degradação do pesticida (Mansour *et al.*, 1999; Burrows *et al.*, 2002; Garbin *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por Lartiges e Garrigues (1995) e Sakellarides e colaboradores (2003). Embora esses pesquisadores não tenham trabalhado especificamente com soluções contendo ácidos húmicos obtidos comercialmente, eles realizaram os ensaios de degradação do paration metílico usando águas contendo diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido (ex.: água destilada, subterrânea, do mar, de rios e lagos) e chegaram à conclusão que se aumentando a concentração de carbono orgânico dissolvido, tende-se a diminuir o tempo de meia-vida desse pesticida.

Embora a presença dos ácidos húmicos, como discutido, tenha acelerado a degradação do paration metílico, a fotólise direta foi o processo mais importante para levar à degradação do pesticida em estudo.

Baseado na discussão apresentada por Sakellarides e colaboradores (2003), utilizando-se as constantes de velocidade apresentadas na Tabela 18 e realizando as considerações descritas abaixo, chega-se aos valores mostrados na Tabela 19.

Constante referente à hidrólise (k_{hidr}): **$6,28 \times 10^{-3} \text{ dias}^{-1}$** ;

Constante referente às reações não fotoassistidas mediadas pelo AH (k_{nfAH}): $9,59 \times 10^{-3} \text{ dias}^{-1}$ (AHE) - $6,28 \times 10^{-3} \text{ dias}^{-1}$ (ADE) = **$3,31 \times 10^{-3} \text{ dias}^{-1}$** ;

Constante referente à fotólise direta (k_{fdir}): $2,66 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1}$ (ADC) - $6,28 \times 10^{-3} \text{ dias}^{-1}$ (ADE) = $2,03 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1}$;

Constante referente à fotólise indireta (k_{find}): $4,38 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1} - (k_{\text{hidr}} + k_{\text{nfAH}} + k_{\text{fdir}}) = 1,39 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1}$.

Tabela 19: Constantes de velocidade (k) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) estimados para a degradação do paration metílico via diferentes processos. (k = constante de velocidade e $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida)

Processos de degradação	^a k (dias ⁻¹)	^b $t_{1/2}$ (dias)
Reações não fotoassistidas mediadas pelos AH	$3,31 \times 10^{-3}$	209
Hidrólise	$6,28 \times 10^{-3}$	110
Fotólise indireta	$1,39 \times 10^{-2}$	50
Fotólise direta	$2,03 \times 10^{-2}$	34

^aDeterminadas como descrito anteriormente; ^bDeterminado através da equação: ($t_{1/2} = \ln 2/k$), sendo o k referente a cada processo de degradação.

Avaliando-se os valores apresentados na Tabela 19, observa-se que, nas condições avaliadas no presente trabalho, a ordem de relevância dos processos que levaram à degradação do paration metílico no experimento 1 foi: reações não fotoassistidas mediadas pelos AH < hidrólise < fotólise indireta < fotólise direta. Há poucos trabalhos na literatura que façam essa análise de maneira detalhada, ou seja, que busquem compreender de maneira mais adequada a contribuição de cada processo na degradação do pesticida. No caso do trabalho de Sakellarides e colaboradores (2003), onde há um maior detalhamento desses processos e onde os pesquisadores trabalharam em condições similares ao do presente estudo, o tempo de meia-vida do paration metílico, via o processo de fotólise direta foi determinado como sendo igual a 35 dias. Valor bem próximo ao encontrado no presente trabalho. Acredita-se que informações como essa também são relevantes para que se possa prever de maneira mais adequada o destino do paration metílico em águas naturais.

2.2.3 Formação do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 1

Ao longo do experimento 1 foi realizada a quantificação do paraoxon metílico e, ainda, foi avaliada a toxicidade das soluções frente ao teste capaz de determinar a porcentagem de inibição da AChE. Antes que os resultados dessas análises sejam apresentados e discutidos é importante lembrar que, a maioria dos trabalhos que

estudam a degradação de pesticidas organofosforados em matrizes aquosas sob ação da radiação solar visando prever o que ocorre com os mesmos em ambientes naturais (Lartiges e Garrigues, 1995; Castillo *et al.*, 1997; Mansour *et al.*, 1997; Sakellarides *et al.*, 2003; Druzina e Stegu, 2007; Araujo *et al.*, 2007 e 2013), não quantifica os subprodutos gerados, apenas os identificam e, além disso, não avaliam a toxicidade da solução ao longo do ensaio. Poucos pesquisadores fazem essas avaliações (Zoh *et al.*, 2006) e deixam claro em seus trabalhos que se trata de um diferencial. Nesse sentido, é importante avaliar as velocidades com as quais os pesticidas organofosforados sofrem degradação em diferentes ambientes aquáticos naturais, porém, associar esses dados com a quantificação de alguns subprodutos gerados e com avaliação da toxicidade das soluções ao longo dos testes de degradação torna o estudo mais completo.

Na Figura 26 são mostrados os resultados obtidos para a determinação do paraoxon metílico e para a avaliação da porcentagem de inibição da AChE ao longo do experimento 1. Nos anexos 7 e 8 são apresentados ainda alguns cromatogramas obtidos para a determinação do paraoxon metílico.

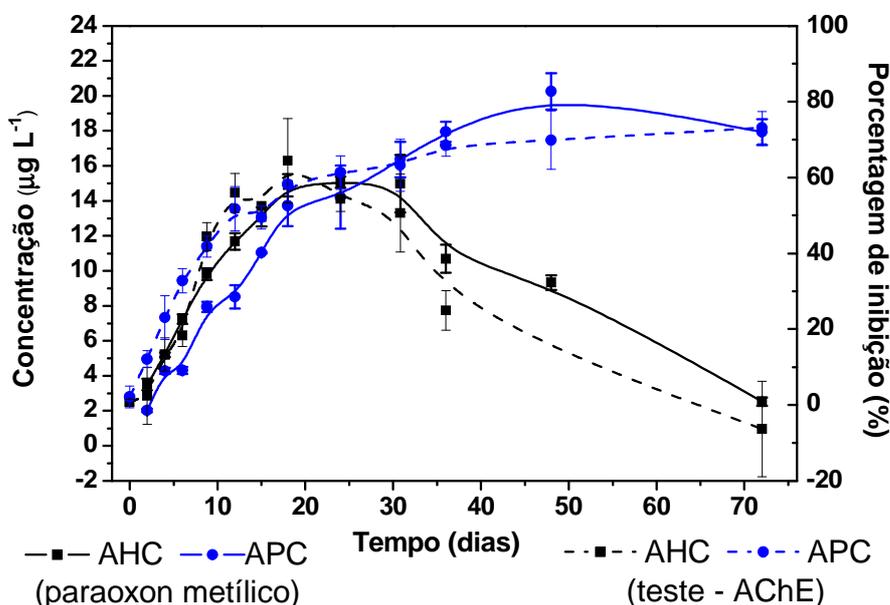


Figura 26: Concentração do paraoxon metílico, em $\mu\text{g L}^{-1}$, e porcentagem de inibição da AChE ocasionada pelas soluções ao longo do experimento 1.

(As barras de erro representam a estimativa do desvio padrão para triplicata)

Com relação à análise do paraoxon metílico ao longo do teste de degradação, o mesmo só foi quantificado nas soluções contendo o pesticida que foram expostas

diretamente a radiação solar, AHC e APC. Nas demais, AHE e APE, ele encontrava-se sempre abaixo dos limites de detecção, ou seja, provavelmente não foi formado quando as soluções contendo o pesticida foram acondicionadas no escuro. Desta forma, chega-se à conclusão que o mesmo é um subproduto oriundo da degradação fotoquímica do paration metílico. Resultados similares foram encontrados por Sakellarides e colaboradores (2003), Druzina e Stegu (2007) e Araújo e colaboradores (2013). Embora esses pesquisadores cheguem a mesma conclusão, eles não discutem como essa conversão acontece.

Nesse sentido, como o paraoxon metílico foi detectado tanto na solução preparada com água ultrapura que foi exposta diretamente a radiação solar (APC) como naquela contendo matéria orgânica dissolvida (AHC), acredita-se que o mesmo pode ser formado tanto pelo processo de fotólise direta como indireta.

No caso da formação desse subproduto via o processo de fotólise direta, Garbin e colaboradores (2007), estudando a degradação fotoquímica da atrazina, imazaquin e iprodiona em água ultrapura utilizando radiação com comprimento de onda superior a 280 nm, mostraram que pequenas sobreposições entre o espectro de absorção dos pesticidas e a radiação que chega a solução são suficientes para que o processo de fotólise direta possa ocorrer. Em 2002, Santos e Rezende, também já haviam realizado essa verificação trabalhando com o paration etílico em água ultrapura e radiação com comprimento de onda superior a 280 nm ou 313 nm. Desta forma, observa-se na Figura 24 que a radiação que chega à solução ($\lambda > 290$ nm) quando a mesma é exposta ao sol é capaz de interagir com o paration metílico e, provavelmente, de realizar a fotólise direta dessa substância. Na verdade, acredita-se que, essa absorção de radiação, entre 290 e 300 nm, faz com que o que o processo de fotólise direta do pesticida em estudo se inicie, uma vez que, ela é capaz de promover elétrons presentes na molécula. Uma vez iniciado o processo de fotólise direta, provavelmente com a quebra da ligação π entre o fósforo e o enxofre (Meallier *et al.*, 1977), o átomo de oxigênio que substitui o enxofre nessa conversão poderia vir das moléculas de água ou de oxigênio, já que, trabalhou-se sempre com solução aquosa e a concentração de oxigênio dissolvido nas soluções no início do experimento era de aproximadamente $7,70 \text{ mg L}^{-1}$. Porém, Weber e colaboradores (2009), trabalhando com a fotólise direta do paration metílico em água ultrapura com e sem oxigênio dissolvido (desgaseificada) e utilizando radiação com comprimento

de onda superior a 300 nm, mostraram que a formação do paraoxon metílico independe da presença da molécula de O₂. Desta forma, acredita-se que o oxigênio que substitui o enxofre provém da molécula de água e, baseado no que foi discutido e nas hipóteses apresentadas por Méallier e colaboradores (1977), na Figura 27 apresenta-se um possível caminho para a formação do paraoxon metílico via o processo de fotólise direta.

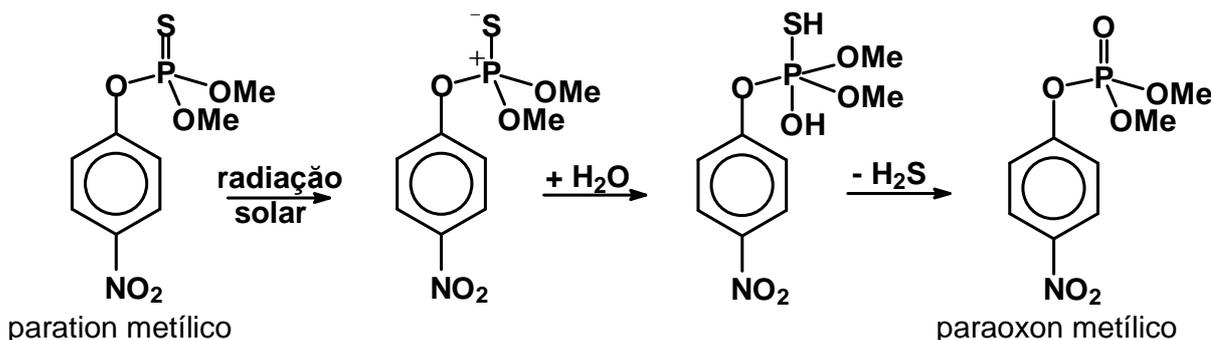


Figura 27: Conversão do paration metílico em paraoxon metílico via o processo de fotólise direta.

Vale ressaltar que, o caminho proposto por Weber e colaboradores (2009) para a formação do paraoxon metílico via o processo de fotólise direta é diferente. Eles acreditam que o grupo nitro, presente na estrutura do paration metílico, ao ser irradiado em solução aquosa possibilita a formação de radicais hidroxila que posteriormente levam a conversão do paration metílico a paraoxon metílico. Nesse sentido, Araujo (2004) mostrou que há conversão do clorpirifós em clorpirifós-oxon em solução aquosa sob irradiação solar, mas, como pode ser visto na Figura , não há grupo nitro na estrutura do clorpirifós. Desta forma, acredita-se que a suposição de Weber e colaboradores (2009) esteja equivocada.

Já no caso da geração do paraoxon metílico via o processo de fotólise indireta, provavelmente é o radical hidroxila formado nas soluções contendo ácido húmico que foram expostas diretamente a radiação solar (AHC) que participa dessa conversão (Mansour *et al.*, 1999; Garbin *et al.*, 2007). Garbin e colaboradores (2007) mostraram, através da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (*EPR*, do inglês *electron paramagnetic resonance*), que há formação de radicais hidroxila quando soluções contendo ácidos húmicos são irradiadas ($280 < \lambda < 480 \text{ nm}$). Sendo assim, na Figura 28 é proposto um caminho para a conversão do paration

frente ao teste de inibição da AChE, que os pesticidas originais que possuem a ligação P=S.

Relacionando os resultados obtidos nessa parte do trabalho com alguns presentes na literatura (Dzyadevych e Chovelon, 2002; Zoh *et al.*, 2006; Kralj *et al.*, 2007a e b), observa-se que os encontrados por Dzyadevych e Chovelon (2002) e Kralj e colaboradores (2007a e b) são similares aos do presente estudo, enquanto que, há certas diferenças com os determinados por Zoh e colaboradores (2006).

Dzyadevych e Chovelon (2002), por exemplo, avaliando a toxicidade das soluções ao longo da degradação do paration metílico por fotólise direta promovida por lâmpada, mostraram que há acréscimo da inibição da AChE conforme a concentração de paraoxon metílico aumenta. Nesse trabalho, os autores mostraram ainda que, quando se usa o teste de toxicidade com a bactéria *Vibrio Fischeri*, os resultados não são similares. Nesse caso, a formação do paraoxon metílico não aumenta a toxicidade da solução. Nesse sentido, os próprios autores e, também, outros (Aydin *et al.*, 2011), mostram que para esse teste, o paration metílico é mais tóxico que o paraoxon metílico. Provavelmente, como os próprios autores mencionam, a inibição dessa bactéria pelos compostos organofosforados não se dá pela inibição da AChE. Por isso, uma maior ação anticolinesterásica do paraoxon metílico nesse caso não resulta numa maior inibição dessa bactéria.

Kralj e colaboradores (2007a e b), trabalhando com a degradação do clorpirifós e do malation por fotólise direta ou por fotocatalise heterogênea (TiO₂) utilizando radiação artificial em ambos os casos, também mostraram que conforme ocorre a degradação dos pesticidas originais com a ligação P=S e a formação dos subprodutos contendo a ligação P=O, a porcentagem de inibição da AChE aumenta. Indicando assim, mais uma vez, que há relação entre o aumento da inibição da AChE e a formação dos subprodutos contendo a ligação P=O.

Com relação ao estudo desenvolvido por Zoh e colaboradores (2006), os mesmos avaliaram a degradação do paration metílico por fotólise direta e fotocatalise heterogênea (TiO₂), utilizando o sol como fonte de radiação em ambos os casos, e analisaram o paraoxon metílico e o *p*-nitrofenol. Estes autores avaliaram a toxicidade das soluções ao longo dos testes de degradação utilizando a bactéria *Vibrio Fischeri* e o crustáceo *Daphnia Magna*, não usando o teste de inibição da

AChE. Os resultados obtidos pelos mesmos mostraram que houve redução na toxicidade das soluções conforme o paration metílico degradava e formava o paraoxon metílico e o *p*-nitrofenol. Para o teste utilizando-se a bactéria *Vibrio Fischeri* esse resultado é realmente esperado, pois, como já mencionado, o paration metílico é mais tóxico para a mesma. Com relação ao teste com *Daphnia Magna*, embora no caso estudado pelos autores, a toxicidade das soluções tenha realmente diminuído com a degradação do paration metílico, não será sempre que isso irá acontecer. Segundo Gälli e colaboradores (1994) e Aydin e colaboradores (2011), geralmente, os subprodutos que possuem a ligação P=O são mais tóxicos frente ao teste com *Daphnia Magna* do que seus compostos originais com a ligação P=S. No caso do paration metílico e do paraoxon metílico, por exemplo, os valores de EC₅₀ determinados para os mesmos foram, respectivamente, 1,14 mg L⁻¹ e 0,28 mg L⁻¹ (Aydin *et al.*, 2011). Desta forma, provavelmente, no caso dos experimentos realizados por Zoh e colaboradores (2006) só houve diminuição da toxicidade frente ao teste com *Daphnia Magna* porque as concentrações de paraoxon metílico não se elevaram o suficiente para que a toxicidade das soluções aumentasse e não porque o paraoxon é menos tóxico frente a esse teste como mencionam os autores.

CAPÍTULO 4

**DEGRADAÇÃO DO PARATION METÍLICO EM
ÁGUA DO RIO PARAÍBA DO SUL: DADOS
CINÉTICOS, DE TOXICIDADE E ANÁLISE
DO PARAOXON METÍLICO**

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias, resultados e discussões referentes ao teste de degradação do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada (experimento 2 - degradação biótica e abiótica do paration metílico). Como será visto, de forma similar ao experimento 1, além da determinação dos dados cinéticos para a degradação do paration metílico nas soluções preparadas a partir da água do rio “in natura” e autoclavada, foi realizada a avaliação da toxicidade das mesmas frente ao teste de inibição da AChE e a determinação da concentração do paraoxon metílico ao longo do teste de degradação. Nesse capítulo ainda são apresentadas as metodologias, resultados e discussões referentes à validação do método de análise utilizado para quantificar o paration metílico e o paraoxon metílico nas soluções utilizadas nessa etapa do trabalho.

1. METODOLOGIA

1.1 Coleta e tratamento inicial da água do rio Paraíba do Sul

A coleta da água do rio Paraíba do Sul para a realização do experimento 2 foi feita no dia 28/08/2014. A aquisição da água aconteceu antes da passagem do rio pelo centro do município de Campos dos Goytacazes-RJ (21°44'23.41”S 41°19'58.71”W). No próprio local de coleta, foram determinados os valores de pH (medidor de pH-MV-Temperatura - Lutron - pH206) e da concentração de oxigênio dissolvido (medidor de oxigênio - Lutron – DO5510).

No laboratório, toda a água do rio coletada foi filtrada a vácuo (filtro qualitativo nº 1 - 11 µm - 90 mm - Whatman) e parte dessa água filtrada foi autoclavada (120 °C e 1,1 atm durante 20 minutos). Neste trabalho, a água do rio que foi apenas filtrada é denominada de água do rio “in natura” (RI), enquanto que, a que foi filtrada e autoclavada, é denominada de água do rio autoclavada (RA).

O processo de autoclavagem foi realizado no Instituto Federal Fluminense – Campus/Campos-Centro utilizando uma autoclave vertical de 50 litros (Phoenix Luferco – AV30). A verificação da eficiência do processo de esterilização foi feita utilizando-se a fita de autoclave (Autoclave 1255 – Vapor da 3M) durante o processo de autoclavagem e, ainda, realizando-se, em duplicata, semeaduras em placas de contendo o meio APC (HIMEDIA), do inglês *Plate Count Agar*, da água do rio “in

natura” e autoclavada. Após aplicação das águas no meio de cultivo, as placas foram incubadas por 48 horas em estufa (SPlabor – SP200) a 37 °C.

Após o processo de autoclavagem, as águas foram utilizadas para realizar a validação do método de análise e para o preparo das soluções que foram utilizadas no experimento 2. Um volume das mesmas foi utilizado, ainda, para a realização de análises físico-químicas.

1.2 Análises físico-químicas realizadas na água do rio “in natura” e autoclavada

As análises físico-químicas foram realizadas para a água do rio “in natura” e autoclavada separadamente. As análises de condutividade e pH foram realizadas no próprio laboratório. O valor de condutividade foi determinado utilizando-se um condutivímetro de bancada (Biocristal – NTCVM) da Digimed e o valor de pH foi determinado usando-se um pHmetro de bancada (B374) da Micronal.

As determinações dos seguintes íons: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , Pb^{2+} e Cd^{2+} foram realizadas, de maneira terceirizada no Laboratório de Química de Solos da FUNDENOR, sob responsabilidade técnica do Engenheiro Químico Lauro Robaina Rangel – CREA-RJ 1982105615.

Assim como no experimento 1, as análises de carbono orgânico dissolvido foram feitas pelo Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LCA/UENF). Para essas quantificações foi adicionado 5 μ L de HCl 2 mol L^{-1} nas soluções e as medidas foram feitas no aparelho TOC 5000 (Shimadzu) com injetor automático ASI – 5000.

1.3 Validação do método de análise

A validação do método de análise utilizado para quantificar o paration metílico e o paraoxon metílico em água do rio “in natura” e autoclavada foi realizada de maneira idêntica a apresentada no capítulo 3. Nesse procedimento, assim como para a solução do pesticida em água contendo ácido húmico, a extração em fase sólida foi realizada apenas com o cartucho SampliQ OPT (60 mg/3 mL) da Agilent Technologies.

1.4 Degradação biótica e abiótica do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada – experimento 2

1.4.1 Preparo e exposição das soluções à radiação solar

Para a realização do teste de degradação foram preparadas soluções do paration metílico (Pestanal – 99,8 %) em água do rio “in natura” e autoclavada na concentração aproximada de $1,30 \text{ mg L}^{-1}$. Essas soluções foram deixadas sob agitação por meia hora e depois desse tempo foi determinada a concentração de oxigênio dissolvido (medidor de oxigênio – Lutron – DO5510). Após esse procedimento, as soluções foram transferidas, sem “headspace”, para frascos de borossilicato de 40 mL da Weathon. Alguns desses frascos, antes da exposição à radiação solar, foram envolvidos com papel alumínio com o objetivo de se avaliar os processos de degradação não fotoassistidos (ex. hidrólise, termólise e reações redox que ocorrem na ausência de radiação). Desta forma, nesse experimento, a degradação do paration metílico foi avaliada em quatro condições. Um resumo das mesmas e, ainda, os prováveis processos que podem levar à degradação do pesticida em estudo em cada uma delas, encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20: Condições nas quais a degradação do paration metílico (PME) foi avaliada no experimento 2, siglas utilizadas e prováveis processos de degradação do pesticida em estudo nas mesmas.

Condições	Siglas	Processo(s) de degradação provável(veis)
PME em água do rio autoclavada protegida com papel alumínio	RAE	Hidrólise, termólise e reações não fotoassistidas mediadas pela matéria orgânica e outras substâncias
PME em água do rio “in natura” protegida com papel alumínio	RIE	Hidrólise, termólise, degradação biótica e reações não fotoassistidas mediadas pela matéria orgânica e outras substâncias
PME em água do rio autoclavada exposta diretamente à radiação solar	RAC	Hidrólise, termólise, reações não fotoassistidas mediadas pela matéria orgânica e outras substâncias, fotólise direta e indireta
PME em água do rio “in natura” exposta diretamente à radiação solar	RIC	Hidrólise, termólise, degradação biótica, reações não fotoassistidas mediadas pela matéria orgânica e outras substâncias, fotólise direta e indireta

Assim como no experimento 1, a exposição das soluções à radiação solar foi feita no telhado do anexo do Centro de Ciência e Tecnologia (CCT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a qual está localizada no município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil, tendo as seguintes coordenadas geográficas: 41,2914° W e 21,7609° S. Os frascos contendo as soluções foram imersos em um grande banho de água (1000 L) segundo procedimento descrito por Araújo (2006) e Araújo e colaboradores (2007). A exposição das soluções ocorreu entre os dias 31/08/2014 e 11/11/2014, Figura 29.



Figura 29: Frascos de borossilicato, contendo as soluções com paration metílico, expostos ao sol imersos em água no tempo inicial do experimento 2.

(A = Soluções expostas diretamente à radiação solar “Claro - C”; B = Soluções expostas à radiação solar envolvidas (protegidas) com papel alumínio “Escuro - E”)

Todos os demais procedimentos com relação à exposição das soluções a radiação solar foram feitos de maneira idêntica aos realizados para o experimento 1 (item 1.4.1 do capítulo 3).

1.4.2 Quantificação do paration metílico e do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 2

Para se avaliar a degradação do paration metílico e a possível formação do paraoxon metílico ao longo do experimento 2, foram realizadas quantificações no

tempo inicial (quadruplicata) e após a exposição ao sol durante 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 25, 30, 43, 55 e 72 dias. Para cada um dos dias mencionados, três frascos (triplicata) de cada uma das quatro condições avaliadas foram retirados para a realização das análises. Os processos utilizados para realizar a quantificação do paration metílico e do paraoxon metílico foram descritos no item 1.2 do capítulo 3.

Nos mesmos dias que foram realizadas as quantificações do paration metílico e do paraoxon metílico, foram determinados os valores de inibição da AChE, em triplicata, para cada uma das condições avaliadas no experimento. O procedimento descrito no item 1.2 do capítulo 2 foi o utilizado para essas determinações. Um volume de 10,0 μL das soluções aquosas foi o utilizado nos testes e o controle foi feito, em sextuplicata, utilizando-se também 10,0 μL das respectivas matrizes aquosas (água do rio “in natura” e autoclavada) usadas no preparo das soluções iniciais de paration metílico. Foi realizado, ainda, um teste para verificar se havia, na água do rio Paraíba do Sul “in natura”, substâncias que inibiam a AChE antes da fortificação da mesma com paration metílico. Para isso realizou-se o teste de inibição, em sextuplicata, utilizando-se 10,0 μL da água do rio “in natura” e 10,0 μL água ultrapura (controle).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Tratamento inicial da água do rio Paraíba do Sul e análises físico-químicas

Com relação à verificação da eficiência do processo de autoclavagem, ambos os procedimentos, uso da fita de autoclave e semeadura das placas contendo o meio APC, mostraram que a esterilização foi realizada de maneira adequada. A Figura 30, por exemplo, apresenta placas que foram semeadas com a água do rio “in natura” e autoclavada e deixadas em estufa por 48 h a 37 °C. Observando-se a mesma, chega-se à conclusão que só houve crescimento de microrganismos na placa semeada com água do rio “in natura”.

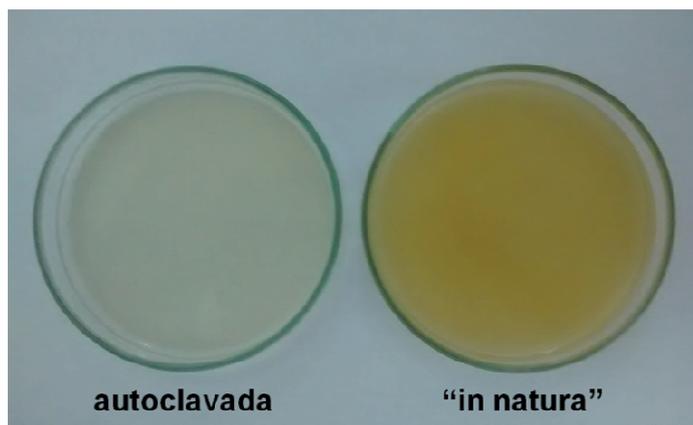


Figura 30: Placas que foram semeadas com água do rio “in natura” ou autoclavada e deixadas em estufa por 48 h a 37 °C.

Com relação às análises físico-químicas da água do rio “in natura” e autoclavada, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Análises físico-químicas da água do rio “in natura” e autoclavada realizadas no presente estudo e alguns parâmetros presentes na resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) do Ministério do Meio Ambiente.

Matrizes / Análises	Água do rio		^a Parâmetros CONAMA 357
	“in natura”	autoclavada	
^b Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	6,00		Maior que 5
^b pH	7,20		6 - 9
^c COD (mg L ⁻¹)	2,94	2,91	-
Condutividade (μS cm ⁻¹)	74	77	-
^d K ⁺	2,35	2,74	-
Na ⁺	6,21	6,77	-
Ca ²⁺	8,36	9,03	-
Mg ²⁺	1,37	1,44	-
Fe ³⁺	0,11	0,07	0,3
Cu ²⁺	^e nd	nd	0,009
Zn ²⁺	nd	nd	0,18
Mn ²⁺	nd	nd	0,1
Pb ²⁺	nd	nd	0,01
Cd ²⁺	nd	nd	0,001
CO ₃ ²⁻	nd	2,25	-
HCO ₃ ⁻	13,72	10,83	-
SO ₄ ²⁻	2,00	1,80	250
Cl ⁻	5,83	6,58	250
Total dos íons analisados (mg L ⁻¹)	37,12	41,51	-

^aÁgua doce de classe 2; ^blocal de coleta; ^cCarbono Orgânico Dissolvido (COD); ^dConcentração dos íons em mg L⁻¹; ^enão detectado.

Além das análises físico-químicas, foram obtidos os espectros UV-VIS dessas matrizes, Figura 31. Nessa figura são apresentados também os espectros UV-VIS das matrizes fortificadas com paration metílico e da água ultrapura contendo ácidos húmicos utilizada no experimento 1 para comparação e, ainda, do frasco de borossilicato no modo de transmitância.

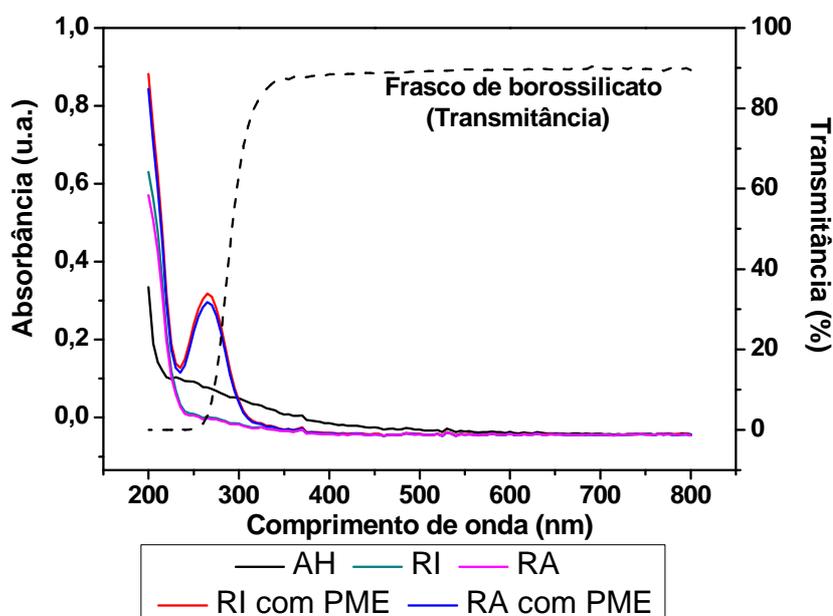


Figura 31: Espectros UV-Vis obtidos, **no modo de absorbância**, para a água do rio “in natura” (RI) e autoclavada (RA), fortificadas ou não com paration metílico (PME), para a solução aquosa contendo ácido húmico utilizada no experimento 1 (AH) e, **no modo de transmitância**, para o frasco de borossilicato utilizado nos testes de degradação.

Iniciando a análise da Tabela 21, pode-se afirmar que o oxigênio dissolvido, pH, Fe^{3+} , SO_4^{2-} e Cl^- estão dentro das especificações da resolução 357/2005 do CONAMA para a água utilizada no presente estudo. Com relação aos demais íons que são regulamentados por essa resolução e foram analisados, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} , provavelmente os mesmos também se encontram dentro das especificações uma vez que não foram detectados.

Ainda com relação à Tabela 21, observa-se que os valores de carbono orgânico dissolvido (COD) apresentados são mais baixos que o obtido para a solução de ácido húmico utilizada no experimento 1, $3,72 \text{ mg L}^{-1}$. Esses valores são também menores que os encontrados por Araujo e colaboradores (2007) para a água do mesmo rio: $8,6$ e $6,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, para a água do rio “in natura” e autoclavada. Nesse sentido, a água do rio Paraíba do Sul coletada para a

realização do experimento 2 apresentava-se inesperadamente límpida e essa baixa turbidez corrobora os baixos e incomuns valores de carbono orgânico dissolvido (COD) que foram encontrados. Além disso, observa-se na Figura 31, que as águas do rio “in natura” e autoclavada utilizadas no experimento 2, RI e RA, respectivamente, praticamente não absorvem radiação na região do visível. A absorção das mesmas nessa região também é menor do que a observada para a solução de ácidos húmicos utilizada no experimento 1. Isso, mais uma vez, mostra que essas matrizes (água do rio “in natura” e autoclavada) estavam extremamente límpidas.

2.2 Validação do método de análise

Como pode ser observado na Figura 32 A e B o método proposto se mostrou seletivo para a análise do paration metílico e do paraoxon metílico em água do rio “in natura” e autoclavada, já que, não houve substâncias que, após a realização do processo de extração/concentração e injeção da água do rio “in natura” e autoclavada (brancos), apresentassem o mesmo tempo de retenção desses compostos.

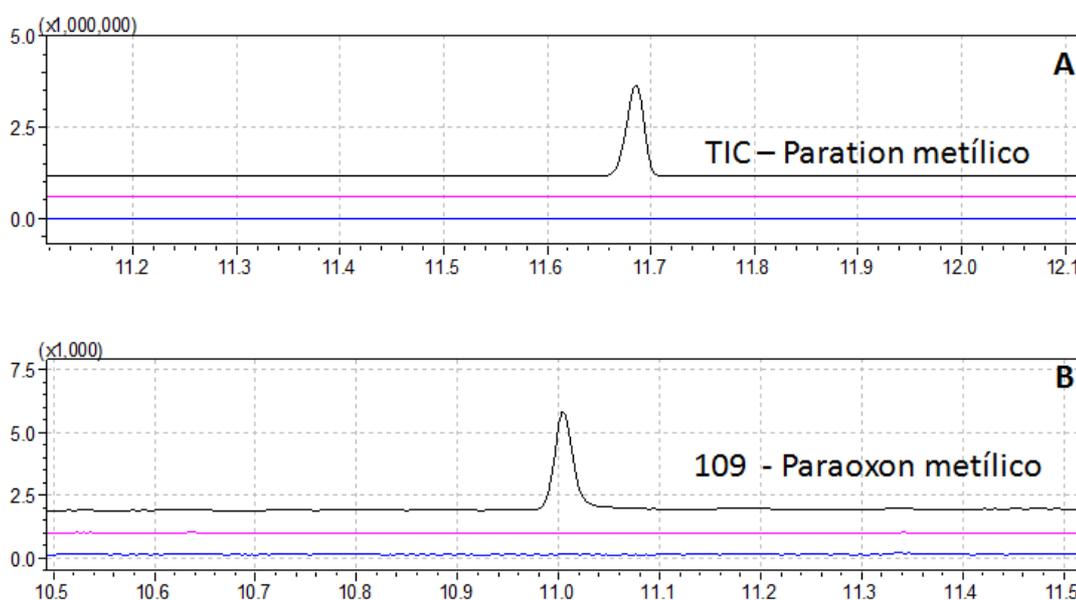


Figura 32 A e B: Comparação de cromatogramas obtidos a partir dos brancos de diferentes matrizes extraídos com o cartucho SampliQ OPT (linha rosa = água do rio “in natura” e linha azul = água do rio autoclavada) com um cromatograma obtido a partir do ponto mais concentrado da curva analítica (linha preta) do paration metílico (A) e do paraoxon metílico (B).

Os resultados obtidos para a taxa de recuperação das substâncias de interesse em água do rio “in natura” e autoclavada são mostrados na Figura 33.

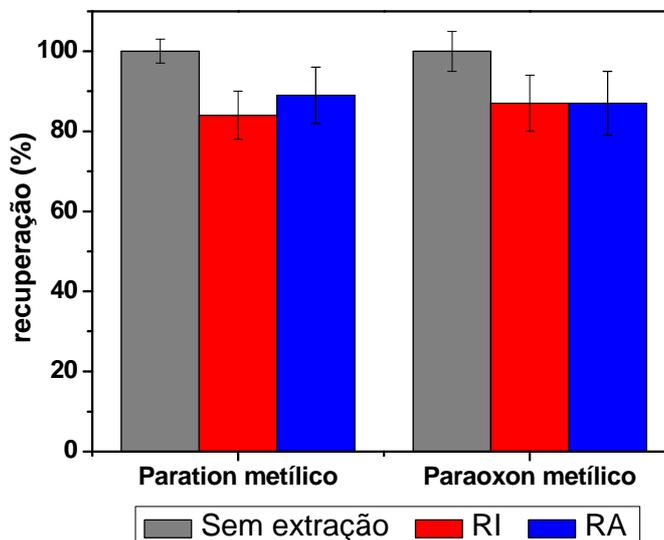


Figura 33: Taxas de recuperação do paration metílico e do paraoxon metílico em água do rio “in natura” (RI) e autoclavada (RA) utilizando-se o cartucho SampliQ OPT para extração em fase sólida.

(As barras de erro apresentadas se referem aos limites de confiança da média com 95 % de probabilidade ($n=5$; $t_{\text{student}}=2,78$))

Analisando-se a Figura 33, observa-se que, assim como para a extração das substâncias de interesse em água ultrapura com e sem ácidos húmicos, valores elevados de recuperação foram encontrados quando se utilizou como matrizes a água do rio “in natura” e autoclavada. Esses valores, acima de 84,0 %, foram julgados adequados para que o método de análise proposto fosse utilizado para a realização da quantificação das substâncias de interesse no experimento 2.

Após as avaliações da seletividade, exatidão e precisão do método de análise, a etapa seguinte foi verificar a linearidade do método na faixa de interesse. Os parâmetros das curvas analíticas que foram preparadas para esta etapa do trabalho são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22: Parâmetros das curvas analíticas do paration metílico (1,30; 1,00; 0,700; 0,400 e 0,0500 mg L⁻¹) e do paraoxon metílico (30,0; 15,0; 7,50; 3,75 e 0,500 µg L⁻¹) em água do rio “in natura” e autoclavada.

Substância/Matriz	Água do rio “in natura”		Água do rio autoclavada	
	Equação da reta	r	Equação da reta	r
Paration metílico	1,48E+06 X + 7,90E+03	0,996	1,30E+06 X + 2,33E+04	0,992
Paraoxon metílico	1,60E+02 X + 1,15E+02	0,990	1,55E+02 X + 1,20E+02	0,991

Analisando-se a Tabela 22, observa-se que, assim como ocorreu para o experimento 1, as curvas analíticas confeccionadas foram julgadas adequadas para serem utilizadas no experimento 2, uma vez que os valores de r encontrados foram superiores a 0,990.

Os valores de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) que foram determinados para essa etapa do trabalho são mostrados na Tabela 23. Pelos motivos já mencionados no capítulo 3, eles possibilitam que o método de análise proposto seja utilizado ao longo do experimento 2.

Tabela 23: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método de análise, em µg L⁻¹, obtidos para determinação do paration metílico (PME) e do paraoxon metílico (POM) em água ultrapura com e sem ácidos húmicos.

Substância/ Matriz	Rio “in natura” (µg L ⁻¹)				Rio autoclavada (µg L ⁻¹)			
	¹ S	² s	LD	LQ	¹ S	² s	LD	LQ
PME	1,48E+06	27,47	0,0613	0,186	1,30E+06	33,23	0,0844	0,256
POM	1,60E+02	0,810	0,0167	0,0505	1,55E+02	0,74	0,0158	0,0478

¹S: coeficiente angular da curva analítica (obtido após confecção das curvas analíticas); ²s: estimativa do desvio padrão do branco (obtido após as injeções dos cinco extratos oriundos do branco).

2.3 Degradação do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada – experimento 2

2.3.1 Exposição das soluções à radiação solar

A Tabela 24 apresenta dados referentes à intensidade da radiação solar no período de realização do experimento 2, assim como, as médias das temperaturas máximas e mínimas do banho utilizado e do ambiente próximo ao mesmo. Analisando-se a mesma, observa-se que, de forma similar ao observado no experimento 1, o uso do banho foi eficiente para evitar grandes variações na

temperatura das soluções contendo o pesticida e, evitou ainda que, as mesmas chegassem a temperaturas elevadas.

Tabela 24: Médias da intensidade da radiação e das temperaturas máximas e mínimas do ambiente e do banho com as estimativas do desvio padrão, entre parênteses, no período no qual o experimento 2 foi realizado.

Período	Média da temperatura mín. e máx. (°C)		Radiação - W m ⁻²	
	^a Interna	^b Externa	24 h	10:00 às 20:00 ^c
31/08 a 11/11/2014	23 (2)	21 (2)	236	515
inverno/primavera	32 (3)	41 (3)	(318)	(133)

^atermômetro colocado dentro do banho de água; ^btermômetro colocado fora do banho de água, mas próximo ao mesmo; ^cTempo Universal Coordenado (UTC, do inglês *Universal Time Coordinated*) o que equivale no Brasil ao intervalo de 7:00 às 17:00 (horário normal) e de 8:00 às 18:00 (horário de verão).

2.3.2 Resultados da degradação do paration metílico no experimento 2

Os resultados obtidos para a degradação do paration metílico no experimento 2 são apresentados na Figura 34 e na Tabela 25.

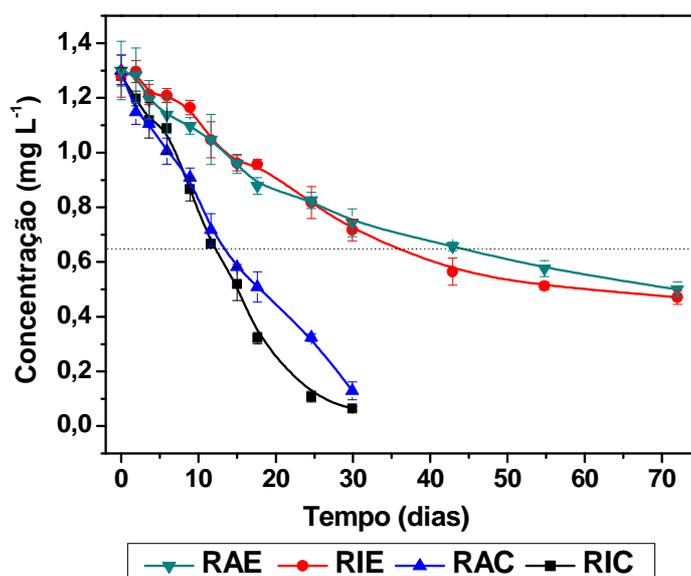


Figura 34: Degradação do paration metílico em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada expostas diretamente (RIC e RAC) ou protegidas com papel alumínio (RIE e RAE) à radiação solar.

(As barras de erro representam a estimativa do desvio padrão para triplicata)

Tabela 25: pH inicial das soluções utilizadas no experimento 2 e dados cinéticos determinados para a degradação do paration metílico nas diferentes condições testadas considerando-se um modelo cinético de ordem zero (RAC e RIC) ou de 1ª ordem (RAE e RIE). (k = constante de velocidade e $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida)

Condições	pH inicial da solução	k	$t_{1/2}$ (dias)	R^2
RAE	6,90	^a $1,37 \times 10^{-2}$	^b 51	^a 0,97
RIE	6,86	^a $1,58 \times 10^{-2}$	^b 44	^a 0,96
RAC	6,90	^c $1,46 \times 10^{-7}$	^d 17	^c 0,98
RIC	6,86	^c $1,71 \times 10^{-7}$	^d 14	^c 0,96

^aDados obtidos através da curva: $\ln [C]/[C_0]$ versus tempo, onde o coeficiente angular é $-k$ (dias^{-1}) e o R^2 é o coeficiente de correlação ao quadrado; ^bDeterminado através da equação: ($t_{1/2} = \ln 2/k$); ^cDados obtidos através da curva: concentração versus tempo, onde o coeficiente angular é $-k$ ($\text{mol L}^{-1} \text{dias}^{-1}$) e o R^2 é o coeficiente de correlação ao quadrado; ^dDeterminado através da equação: ($t_{1/2} = [C_0]/2k$).

O modelo cinético de ordem zero se mostrou mais adequado para o tratamento dos dados da degradação do paration metílico nas soluções expostas diretamente a radiação solar (RAC e RIC), enquanto que, para as demais (RAE e RIE), foi o modelo cinético de 1ª ordem.

Analisando-se inicialmente os resultados mostrados na Tabela 25, observa-se que os tempos de meia-vida encontrados para a degradação do paration metílico em água do rio “in natura” e autoclavada são semelhantes (RAE: 51 dias \approx RIE: 44 dias e RAC: 17 dias \approx RIC: 14 dias). Diferenças maiores são encontradas quando se compara os tempos de meia-vida dessa substância nas soluções que foram expostas diretamente à radiação solar ou protegidas com papel alumínio (RIE: 44 dias \gg RIC: 14 dias e RAE: 51 dias \gg RAC: 17 dias). Isso indica que, nessas condições, processos de degradação abióticos são mais relevantes do que os bióticos para levar à decomposição do paration metílico na água do rio Paraíba do Sul. Como pode ser visto na Tabela 26, resultados similares foram encontrados por Araujo e colaboradores (2007) quando os mesmos estudaram a degradação do paration metílico formulado (Folisuper 600 BR da Agripec) também em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada. Analisando a mesma, observa-se que, assim como no presente estudo, os tempos de meia-vida encontrados para a degradação do paration metílico em água do rio “in natura” e autoclavada são semelhantes (5,37 dias \approx 3,47 dias e 3,72 dias \approx 2,75 dias). Nesse sentido, embora Araujo e colaboradores (2007) tenham se preocupado em estudar a degradação do paration metílico via processos bióticos e abióticos, a maioria dos trabalhos que

avaliam a degradação de pesticidas organofosforados em águas naturais sob ação da radiação solar (Lartiges e Garrigues, 1995; Castillo *et. al.*, 1997; Mansour *et. al.*, 1997; Sakellarides *et. al.*, 2003; Druzina e Stegu, 2007) não faz esse tipo de diferenciação e, acredita-se que, informações como essa são relevantes para que se possa prever de maneira mais adequada o destino dessas substâncias em águas naturais.

Tabela 26: Resultados encontrados por Araujo e colaboradores (2007) para a degradação do paration metílico formulado (Folisuper 600 BR da Agripec) em água do rio Paraíba do Sul “in natura” e autoclavada.

Condições	^a t _{1/2}
Água do rio autoclavada exposta à radiação solar protegida com papel alumínio	5,37
Água do rio “in natura” exposta à radiação solar protegida com papel alumínio	3,47
Água do rio autoclavada exposta diretamente à radiação	3,72
Água do rio “in natura” exposta diretamente à radiação	2,75

^aTempo de meia-vida, em dias, obtido através de um modelo cinético de 1ª ordem.

Analisando-se em conjunto, a Figura 34 e a Tabela 25, observa-se que, assim como ocorreu no experimento 1, a degradação do paration metílico foi mais rápida nas soluções que foram expostas diretamente a radiação solar. Os tempos de meia-vida determinados para o pesticida nessas condições foram de: 17 e 10 dias, respectivamente para as condições denominadas de RAC e RIC, enquanto que, quando as soluções foram expostas à radiação solar protegidas com papel alumínio foram de: 51 e 44 dias, respectivamente para as condições denominadas de RAE e RIE. Esses resultados reforçam a hipótese de que a radiação solar desempenha papel relevante na degradação do paration metílico em matrizes aquosas. Resultados semelhantes foram encontrados por Lartiges e Garrigues (1995), Sakellarides e colaboradores (2003) e Druzina e Stegu (2007). Lartiges e Garrigues (1995), por exemplo, estudando a degradação do paration metílico em água do rio Eau Bourde (França), encontraram tempos de meia-vida iguais a 11, 23 e 95 dias quando as amostras foram expostas diretamente a radiação solar ou permaneceram no escuro a 22 e 6 °C, respectivamente. Druzina e Stegu (2007), trabalhando com a degradação do mesmo pesticida em água do rio Kamniska Bistrica (Eslovênia), encontraram tempo de meia-vida igual a 19,7 dias quando a solução foi exposta diretamente a radiação solar. Já quando a solução permaneceu no escuro, a mesma temperatura, eles consideraram o paration metílico estável uma vez que o mesmo

praticamente não sofreu degradação nessa condição. Esses resultados, que são os mais comumente encontrados na literatura, mostram que a radiação solar possui papel importante na degradação do paration metílico. Porém, vale ressaltar que, em alguns casos, parece haver outros fatores preponderantes para levar à degradação do paration metílico em matrizes aquosas. No trabalho realizado por Araujo e colaboradores (2007), por exemplo, como pode ser observado na Tabela 26, o paration metílico apresentou tempos de meia-vida parecidos em todas as condições avaliadas, independente das soluções terem sido expostas diretamente ou não a radiação solar. Nesse trabalho, as condições climáticas eram parecidas com as observadas no presente estudo. As médias das temperaturas máximas e mínimas do banho utilizado por Araujo e colaboradores (2007), por exemplo, foram de 30 e 23 °C, respectivamente, enquanto que, no presente estudo foram de 32 e 23 °C (Tabela 24). Ou seja, parece haver outro processo, diferente da hidrólise, da fotólise, de fatores bióticos, que possui papel relevante na degradação do paration metílico nas condições estudadas por Araújo e colaboradores (2007). Provavelmente havia na água do rio Paraíba do Sul coletada por Araújo e colaboradores (2007) alguma substância capaz de catalisar a degradação do paration metílico que não estava presente na água utilizada no presente estudo. Nesse sentido ainda, Lartiges e Garrigues (1995), estudando a degradação do paration metílico em água de mar, encontraram tempos de meia-vida iguais a 34 e 30 dias quando as soluções foram expostas diretamente a radiação solar ou permaneceram no escuro a 22 °C, respectivamente. Ou seja, também nesse caso, a radiação solar não foi o fator preponderante para levar à degradação do pesticida. O que foi discutido mostra que, embora existam alguns trabalhos na literatura que avaliem a degradação de pesticidas organofosforados em ambientes aquáticos naturais sob ação da radiação solar, ainda há resultados difíceis de serem explicados e que precisam de avaliações adicionais para que possam ser elucidados.

2.3.3 Formação do paraoxon metílico e avaliação da toxicidade das soluções frente ao teste de inibição da AChE ao longo do experimento 2

Assim como realizado no experimento 1, ao longo do experimento 2 foi feita a análise do paraoxon metílico e, também, foi avaliada a toxicidade das soluções

frente ao teste capaz de determinar a porcentagem de inibição da AChE. A Figura 35 apresenta os resultados obtidos nessas determinações.

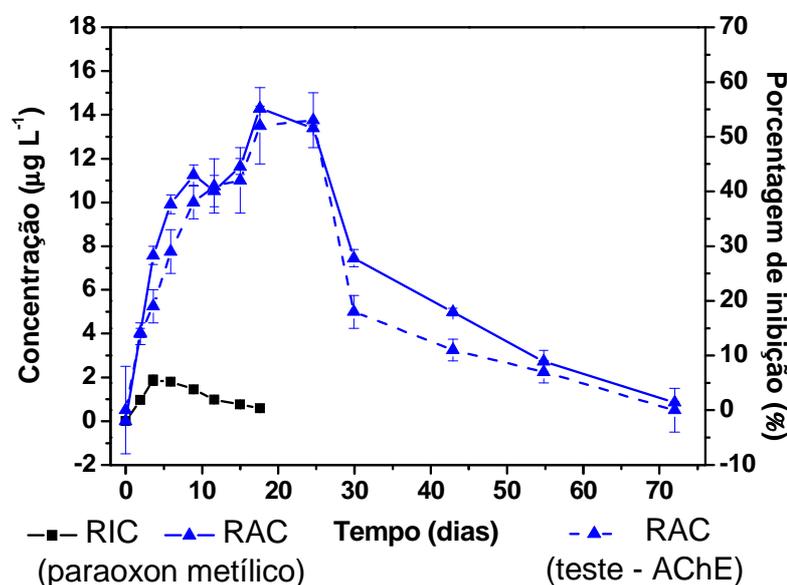


Figura 35: Concentração do paraoxon metílico, em $\mu\text{g L}^{-1}$, e porcentagem de inibição da AChE ocasionada pelas soluções ao longo do experimento 2. (As barras de erro representam a estimativa do desvio padrão para triplicata)

Analisando-se inicialmente a Figura 35, observa-se que, assim como ocorreu no experimento 1, o paraoxon metílico só foi detectado nas soluções que foram expostas diretamente a radiação solar (RIC e RAC). Porém, no caso da solução preparada a partir da água do rio “in natura” que foi exposta diretamente a radiação solar (RIC), o mesmo só foi encontrado em baixas concentrações ($< 2,00 \mu\text{g L}^{-1}$). Provavelmente, essas baixas concentrações determinadas nessa condição (RIC) é devido à degradação mais rápida do paration metílico nessa solução e, também, provavelmente a decomposição também mais rápida do paraoxon metílico. Nesse sentido, há pesquisadores (Deng *et al.*, 2015) que mostram que, em alguns casos, o paraoxon metílico sofre degradação por microorganismos mais rapidamente que o paration metílico. Desta forma, pode ser que a degradação mais rápida do paraoxon metílico ocorra devido a processos bióticos. Porém, para que isso seja afirmado, avaliações adicionais devem ser feitas.

Ainda analisando-se a Figura 35, observa-se que, somente para a solução preparada a partir da água do rio autoclavada que foi exposta diretamente a radiação solar (RAC), houve aumento da inibição da AChE ao longo do experimento 2. Para as demais condições, RIC, RIE e RAE, não foi observado variação na

porcentagem de inibição com relação ao controle. Para as soluções que foram expostas à radiação solar protegidas com papel alumínio, RIE e RAE, isso provavelmente ocorreu porque não houve formação do paraoxon metílico nessas condições. Já para a solução que foi preparada a partir da água do rio “in natura” e foi exposta diretamente a radiação solar, isso provavelmente ocorreu devido a baixa concentração do paraoxon metílico nessa solução. Esses resultados reforçam a ideia de que o aumento da porcentagem de inibição da AChE tem relação direta com o aumento da concentração do paraoxon metílico.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H e de massas obtidos para o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato sintetizado confirmam que o mesmo, embora com baixo rendimento na rota sintética inicialmente proposta, foi obtido com sucesso. Desta forma, foi possível concluir que a proposta de formação dessa substância ao longo da degradação fotoquímica do paration metílico realizada por Araújo (2006) estava correta.

Com relação à determinação dos valores de IC_{50} (3 horas) da AChE para o paration metílico e para alguns dos seus subprodutos, foi possível concluir que a ordem de toxicidade para as substâncias frente ao teste de inibição é: *p*-nitrofenol < O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato < paration metílico < paraoxon metílico. Esses resultados estão em consonância aos dados da literatura e indicam que a formação do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato e do *p*-nitrofenol ao longo da degradação do paration metílico possivelmente leva à diminuição da toxicidade da solução, enquanto que, a formação do paraoxon metílico provavelmente leva ao acréscimo.

Sobre os testes de degradação do paration metílico, devido à complexidade desse processo em ambientes aquáticos naturais, a estratégia utilizada no presente trabalho foi realizar o aumento gradativo das variáveis. Por isso, inicialmente trabalhou-se com soluções do pesticida em água ultrapura com e sem ácidos húmicos e, posteriormente, em água de rio “in natura” e autoclavada.

Com relação aos resultados cinéticos obtidos, os mesmos mostraram que a hidrólise, reações redox não fotoassistidas e processos bióticos, nas condições estudadas, promovem a degradação do pesticida em estudo apenas lentamente. Também baseado nesses resultados, pode-se verificar que a radiação solar possui papel relevante na degradação do paration metílico em solução aquosa, tanto via o processo de fotólise direta como indireta. Porém, fazendo-se uma análise detalhada dos resultados cinéticos obtidos no experimento 1 baseado nas ideias de Sakellarides e colaboradores (2003), foi possível verificar que o processo de fotólise direta, nas condições estudadas nesse experimento, é mais relevante para levar à degradação do pesticida em estudo do que a fotólise indireta.

Com relação aos resultados obtidos na análise do paraoxon metílico e na avaliação da toxicidade da solução ao longo do processo de degradação do

pesticida, os mesmos mostraram que o paraoxon metílico é formado apenas nas soluções expostas diretamente à radiação solar, ou seja, o mesmo é um produto da degradação fotoquímica do paration metílico. Mostraram ainda que, só houve aumento na toxicidade da solução em relação ao tempo inicial também quando as soluções foram expostas diretamente à radiação solar, indicando assim que, há relação entre o aumento da toxicidade da solução e a formação do paraoxon metílico. Somente quando as soluções foram preparadas a partir da água do rio “in natura” e expostas diretamente à radiação solar que não foi observado um acréscimo da toxicidade da solução. Isso ocorreu provavelmente devido as baixas concentrações encontradas para o paraoxon metílico nessas soluções que, provavelmente sofre degradação mais rápida nessas condições. Esse resultado é ambientalmente interessante, uma vez que, indica que essa substância, extremamente tóxica, degrada-se rapidamente na água do rio Paraíba do Sul.

Para finalizar, concluiu-se que o teste de inibição da AChE foi adequado para analisar a variação da toxicidade da solução ao longo da degradação do paration metílico. Desta forma, acredita-se que esse tipo de procedimento deve ser mais explorado com essa finalidade.

2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando-se os resultados obtidos no presente trabalho, propõem-se as seguintes realizações futuras:

- Teste de degradação de outros pesticidas organofosforados que possuam seus processos de degradação em matrizes aquosas pouco conhecidos utilizando-se procedimentos similares aos usados no presente trabalho;
- Realização de teste de degradação do paraoxon metílico para conhecer melhor o seu processo de degradação em diferentes matrizes aquosas.

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2003) Resolução RE n°899 de 29/05/2003.
- Agilent Technologies (2008) *Agilent SampliQ Products for SPE*.
- Almeida, F.V. (2003) Bases técnico-científicas para o desenvolvimento de critérios de qualidade de sedimentos referentes a compostos orgânicos persistentes. Tese (Doutorado em Química) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 114p.
- Araújo, T.M., Campos, M.N.N., Canela, M.C. (2007) Studying the photochemical fate of methyl parathion in natural Waters under tropical conditions. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 87: 937-947.
- Araújo, T.M.R. (2004) *Degradação Abiótica do Clorpirifós: Estudo dos Processos de Fotólise e Hidrólise*. Monografia (Licenciatura em Química) – Campos dos Goytacazes, RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. 46p.
- Araújo, T.M.R. (2006) *Degradação do paration metílico em ambientes aquáticos naturais*. Tese (Mestrado em Ciências Naturais) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 117p.
- Araújo, T.M.R., Canela, M. C., Miranda, P. C. M. L. (2013) Photochemical nitro-nitrite rearrangement in methyl parathion decay under tropical conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 48:4, 251 – 259.
- Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas – GARP (1999) *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos* (apostila).
- Aydin, M.E., Ozcan, S., Beduk, F. (2011) Acute Toxicity of Organophosphorus Pesticides and Their Degradation By-products to *Daphnia magna*, *Lepidium sativum* and *Vibrio fischeri*. Pesticides – Impacts of Pesticides Exposure. Edited by Prof. Margarita Stoytcheva. 446p.
- Azevedo, D.A., Gerchon, E., Reis, E.O. (2004) Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 15 (2): 292-299.
- Azevedo, D.A., Lacorte, S., Vinhas, T., Viana, P., Barceló, D. (2000) Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gás chromatographic-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 879:13-26.
- Azevedo, D.S. (2013) *Utilização do teste de inibição da enzima Acetilcolinesterase aplicado no estudo da degradação abiótica dos agrotóxicos organofosforados*. Monografia (Licenciatura em Química) – Campos dos Goytacazes, RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. 38p.

- Bachman, J., Patterson, H.H. (1999) Photodecomposition of the carbamate pesticide carbofuran: Kinetics and the influence of dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*. 33: 874-881.
- Baird, C. e Cann, M. (2011) *Química ambiental*. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 844p.
- Brasil (1985) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 329 de 02/09/85 publicado no Diário Oficial da União em 03/09/85.
- Brasil (1992). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria da secretaria nacional de defesa agrícola (SNDA) nº 82 de 8/10/1992.
- Brasil (1998) Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - Centro Nacional de Epidemiologia. Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 1998. 523p.
- Brasil (2014) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) - Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos-> em 15/12/2014.
- Brasil (2015) Ministério do Meio Ambiente. <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acessado em: 11 de julho de 2015.
- Briseño-Roa, L., Hill, J., Notman, S., Sellers, D., Smith, A.P., Timperley, C.M., Wetherell, J., Williams, N.H., Williams, G.R., Fersht, A.R., Griffiths, A.D. (2006) Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents. *J. Med. Chem.*, 49:246-255.
- Burrows, H.D., Canle, M., Santaballa, J.A., Steenken, S. (2002) Reaction pathways and mechanism of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 67: 71-108.
- Capobiango, H.L.V. e Cardeal, Z.L. (2005) A solid-phase microextraction method for chromatographic determination of organophosphorus pesticides in fish, water, potatoes, guava and coffee. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16: 907-914.
- Castillo, M., Domingues, R., Alpendurada, M.F., Barceló, D. (1997) Persistence of selected pesticides and their phenolic transformation products in natural waters using off-line liquid solid extraction followed by liquid chromatographic techniques. *Analytica Chimica Acta*. 353: 133-142.
- Chapman, O.L., Heckert, D.C., Reasoner, J.W., Thackaberry, S.P. (1966) Photochemical studies on 9-nitroanthracene. *Journal of the American Chemical Society*. 88: 5550 – 5554.

- Čolović, M., Krstić, D., Petrović, S., Leskovac, A., Joksić, G., Savić, J., Franko, M., Trebše, P., Vasić, V. (2010) Toxic effects of diazinon and its photodegradation products. *Toxicology Letters*. 193:9-18.
- Čolović, M.B., Krstić, D.Z., Ušćumlić, G.S., Vasić, V.M. (2011) Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 100:16-22.
- Comber, S.D.W. (1999) Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pesticide Science*. 55: 696-702.
- CONAMA, Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, 17 de março de 2005, publicada no Diário Oficial da União em 2005.
- Costa, L.G. (2006) Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366: 1-13.
- D'amato, C., Torres, J. P. M., Malm, O. (2002) DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental – Uma Revisão. *Química Nova*, 25: 995-1002.
- Dannenberg, A., Pehkonen, S.O. (1998) Investigation of the heterogeneously catalyzed hydrolysis of organophosphorus pesticides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:325-334.
- Deng, S., Chen, Y., Wang, D., Shi, T., Wu, X., Ma, X., Li, X., Hua, R., Tang, X., Li, Q.X. (2015) Rapid Biodegradation of Organophosphorus Pesticides by *Stenotrophomonas sp. G1*. *Journal of Hazardous Materials*. 297: 17 – 24.
- Druzina, B. e Stegu, M. (2007) Degradation study of selected organophosphorus insecticides in natural Waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 87: 1079-1093.
- Dzyadevych, S.V., Chovelon, J. (2002) A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using Lumistox test and conductometric biosensor technique. *Materials Science and Engineering C21*: 55 – 60.
- Eleršek, T. and Filipič M. (2011) Organophosphorus Pesticides – Mechanisms Of Their Toxicity. Pesticides – The impacts of Pesticides Exposure. Edited by Prof. Margarita Stoytcheva. 446p.
- Ellman, G. L., Courtney, K.D. Jr. V.A., Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7:88-95.
- EPA (2002) Indirect photolysis screening test: sunlight photolysis in waters containing dissolved humic substances, Provisional Test Guidelines, 40 CFR ch. I, pt. 795.

- Fadaei, A., Dehghani, M.H., Nasser, S., Mahy, A.H., Rastkari, N., Shayegui, M. (2012) Organophosphorous Pesticides in Surface Water of Iran. *Bull Environ Contam Toxicol.* 88: 867 – 869.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) – FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/site/424/default.aspx#ancor> em 31/01/2015. Página mantida pela FAO.
- Forget, J., Beliaeff, B., Bocquené, G. (2003) Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology.* 62:195:204.
- Fukuto, T.R. (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health perspectives.* 87:245-254.
- Fukuto, T.R., Metcalf, R.L. (1956) Structure and Insecticidal Activity of Some Diethyl Substituted Phenyl Phosphates. *Agricultural and Food Chemistry* Vol 4, No. 11: 930 – 935.
- Gälli, R., Rich, H. W., Scholtz, R. (1994) Toxicity of organophosphate insecticides and their metabolites to the water flea *Daphnia magna*, the Microtox test and an acetylcholinesterase inhibition test. *Aquatic Toxicology.* 30: 258 – 269.
- Garbin, J.R., Milori, D.M.B.P., Simões, M.L., Silva, W.T.L., Neto, L.M. (2007) Influence of humic substances on the photolysis of aqueous pesticide residues. *Chemosphere.* 66: 1692 – 1698.
- Giordano, A., Richter, P., Ahumada, I. (2011) Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta,* 85: 2425-2429.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports.* 23: 181 – 199.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial – INMETRO (2003) *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008.
- Kammerbauer, J., Moncada, J. (1998) Pesticide residue assessment in three selected agricultural production systems in the Choluteca River Basin of Honduras. *Environmental Pollution.* 103:171-181.
- Kavvalakis, M.P., Tsatsakis, A.M. (2012) The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic Science International.* 218: 111-122.
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S. J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A. (2000) The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin.* 40:780-791.

- Kralj, M.B., Černigoj, U., Franko, M., Trebše, P. (2007b) Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon, and commercial malathion—Products and toxicity studies. *Water Research*. 41:4504-4514.
- Kralj, M.B., Franko, M., Trebše, P. (2007a) Photodegradation of organophosphorus insecticides – Investigations of products and their toxicity using gas chromatography–mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. *Chemosphere*. 67: 99-107.
- Lartiges, S.B., Garrigues P.P. (1995) Degradation kinetics of organophosphorus and organonitrogen pesticides in different waters under various environmental conditions. *Environmental Science & Technology*. 29: 1246-1254.
- Linde-Arias, A. R., Alan F. Inácio, A.F., Alburquerque, C., Marina M. Freire, M.M., Moreira, J.C. (2008) Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the total Environment*. 399:186-192.
- Liu, F., Bischoff, G., Pestemer, W., Xu, W., Kofoet, A. (2006) Multi-residue analysis of some polar pesticides in water samples with SPE and LC-MS-MS. *Chromatographia A*. 63: 233-237.
- Mansour, M., Feicht, E.A, Behechti, A., Schramm K-W. e Kettrup, A. (1999) Determination photostability of selected agrochemicals in water and soil. *Chemosphere*, 39: 575-585.
- Mansour, M., Feicht, E.A., Behechti, A., Scheunert, I. (1997) Experimental approaches to studying the photostability of selected pesticides in water and soil. *Chemosphere*. 35: 39-50.
- Martins, P.R. (2000) Trajetórias tecnológicas e meio ambiente: a indústria de agroquímicos/trangênicos no Brasil. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 345p.
- Matozzo, V., Tomei, A., Marin, M.G. (2005) Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Marine Pollution Bulletin*. 50:1686-1693.
- Méallier, P., Nury, J., Pouyet, B., Coste, C., Bastide, J. (1977) Photodegradation des Molecules Organiques Phytosanitaires. *Chemosphere*. 12: 809 – 814.
- Mortland, M.M. e Raman, K.V. (1967) Catalytic hydrolysis of some organic phosphate pesticides by copper (II). *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 15: 163-167.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J. (2007) Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 14: 289 – 300.
- Patrick, G.L. (2013) An introduction to medicinal chemistry. 5 ed. New York: Oxford University Press

- Pedlowski, M.A., Canela, M.C., Terra, M.A.C., Faria, R.M.R. (2012) Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. *Crop Protection* 31: 113-118.
- Pehkonen, S.O. e Zhang, Q. (2002) The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32: 17-72
- Pelaez, V., Silva, L.R., Araújo, E.B. (2013) Regulation of Pesticides: A Comparative Analysis. *Science and Public Policy*.
- Pinheiro, A.S., Rocha, G.O., Andrade, J.B. (2011) A SDME/GC-MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Microchemical Journal*. 99: 303 – 308.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 27: 771 – 780.
- Sakellarides, T.M., Siskos, M.G., Albanis, T.A. (2003) Photodegradation of selected organophosphorus insecticides under sunlight in different natural waters and soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 83: 33-50.
- Santos, F.F. e Rezende, M.O.O. (2002) Influência do meio químico reacional no comportamento fotoquímico do inseticida paration etílico. *Química Nova*. 25: 53-58.
- Santos, V.M.R., Donnici, C.L., Da Costa, J.B.N, Caixeiro, J.M.R. (2007) Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, 30: 159-170.
- Silva, G.R., Borges Jr., I., Figueroa-Villar, J.D. (2012) Defesa Química: Histórico, Classificação dos Agentes de Guerra e Ação dos Neurotóxicos. *Química Nova*, 35: 2083-2091.
- St-Amand, A.D. e Girard, L. (2004) Determination of Aephate and its degradation product methamidophos in soil and water by solid-phase extraction (SPE) and GC-MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 84:739-748.
- Vialaton, D., Richard, C. (2002) Phototransformation of aromatic pollutants in solar light: photolysis versus photosensitized reactions under natural water conditions. *Aquatic Sciences*. 64: 207-215.
- Vianna, M. S. (2008) Desenvolvimento de biosensor multiparâmetros para análise de neurotoxinas em amostras clínicas e ambientais. Tese (Doutorado em Química) – Rio de Janeiro-RJ, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC-Rio, 132p.

- Wan, H.B., Wong, M.K., Mok, C.Y. (1994) Mercury (II) ion- promoted hydrolysis of someorganophosphorus pesticides. *Pesticide science*. 42: 93-99.
- Ware, G.W. (2001) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 172. New York: Springer.
- Waters Corporation (2003) *Oasis® HLB Product and Generic Method Information*. ExpertEase, Oasis, Symmetry, SymmetryShield and Waters are trademarks of Waters Corporation.
- Weber, J., Kurková, R., Klánová, J., Klán, P., Halsall, C.J. (2009) Photolytic degradation of methyl-parathion and fenitrothion in ice and water: Implications for cold environments. *Environmental Pollution*. 157: 3308 – 3313.
- Wolfe, N.L., Mingelgrin, U., Miller, G. C. (1990) Abiotic transformations in water, sediments and soil. In: Cheng, H.H. (ed.) *Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling*. 2. ed. Madison: Soil Science Society of America. p. 103-168.
- Zoh, K.D., Kim, T.S., Kim, J.G., Choi, K., Yi, S.M. (2006) Parathion degradation and toxicity reduction in solar photocatalysis and photolysis. *Water Science & Technology*. 53: 1 – 8.

ANEXO 1: Extração da AChE de cérebros de ratos

Os ratos para extração da AChE foram gentilmente fornecidos pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), consistindo de animais saudáveis que foram sacrificados depois de estudos no Departamento de Psicologia daquela universidade. Com ajuda de uma tesoura de ponta fina fez-se um orifício na parte de trás da cabeça do rato, que é mais macia, e partiu-se o crânio do animal como mostra a Figura 36.



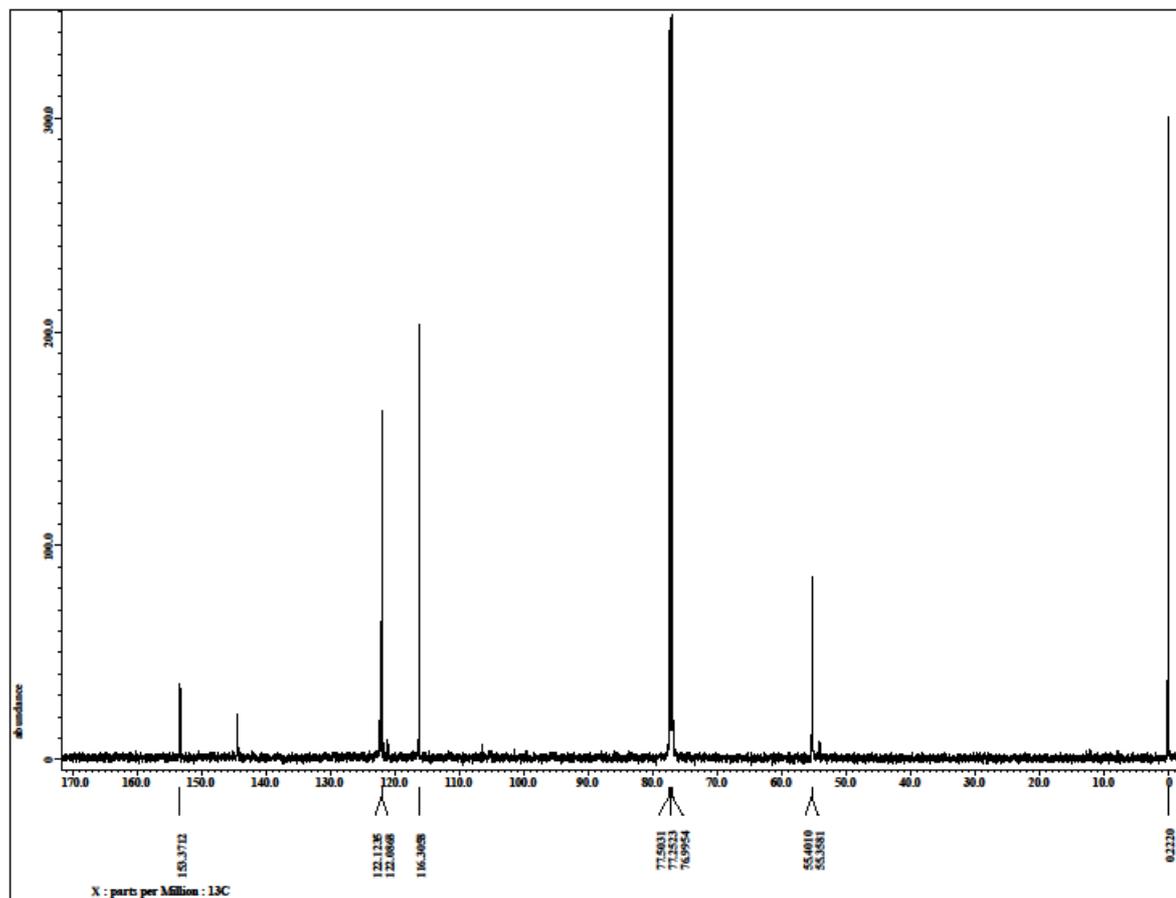
Figura 36: Retirada do cérebro de um rato saudável para extração da AChE.

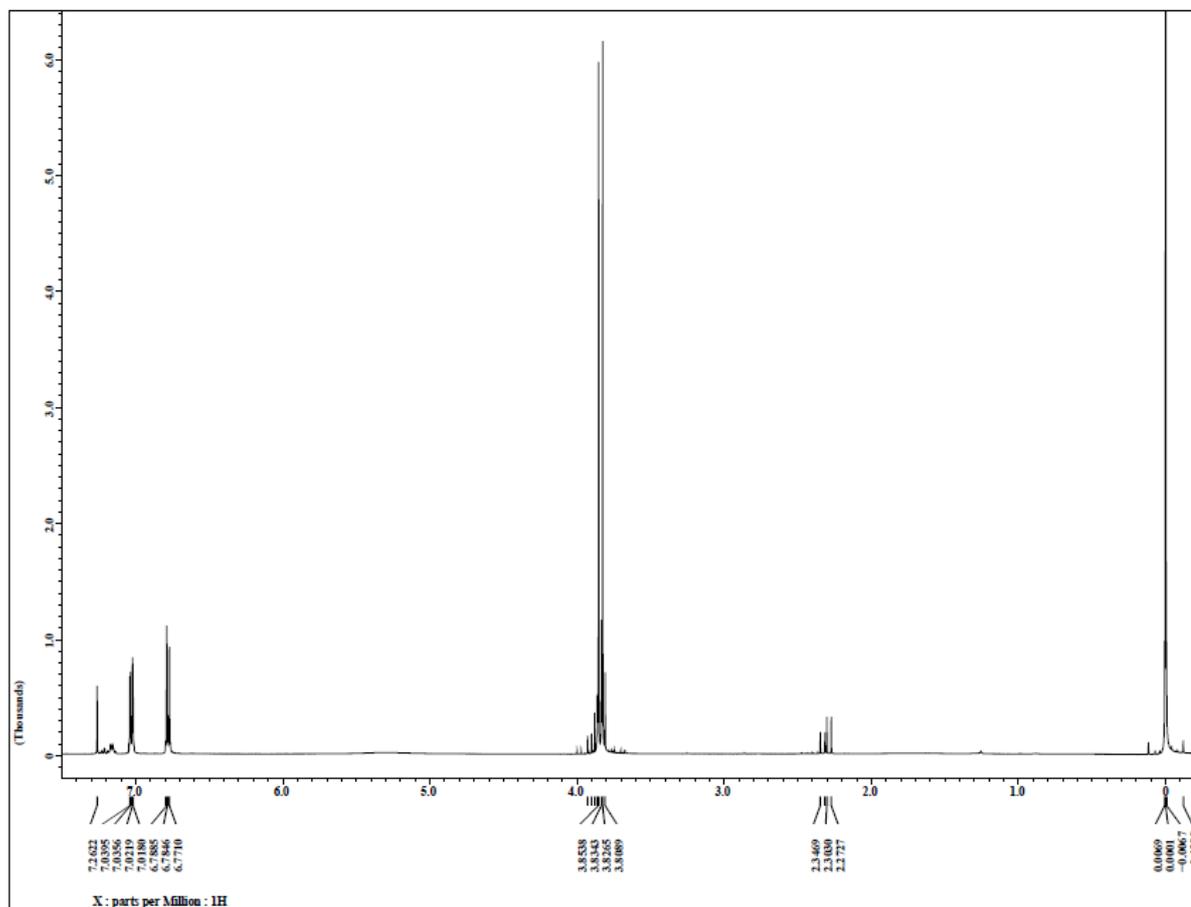
Com o auxílio de uma pinça, o cérebro foi retirado e colocado em um tubo de ensaio com tampa. Todos os ratos foram descartados ao final desse processo. Acrescentou-se água destilada gelada e depois os cérebros foram triturados com a ajuda do aparelho Turrax formando uma mistura mais homogênea de células, tecidos e sangue. Para fazer a extração da enzima, foi preciso centrifugar essa mistura em uma centrífuga refrigerada (HERAEUS MULTIFUGUE modelo X3R) com rotação de 3000 G. O sobrenadante foi separado do precipitado e foi transferido para outro tubo de ensaio para ser centrifugado novamente. O precipitado foi descartado. A Figura 37 mostra a mistura após realização da centrifugação.



Figura 37: Mistura do cérebro de rato após ser triturada e centrifugada.

Após a mistura do cérebro de rato ser triturada, centrifugada, separada do precipitado e armazenada, a extração da enzima estava concluída e a mesma encontrava-se pronta para a realização dos testes. Testes de atividade da AChE no sobrenadante e no sólido foram realizados para verificar a completa extração. A utilização da AChE de cérebros de rato apresenta várias vantagens em relação à purificada. O custo é bem menor, oferece uma simulação mais real da inibição da enzima, pois no extrato existe a presença de diversos tipos de enzima e não só a AChE para metabolizar os compostos e o extrato preparado é mais sensível à presença desses agrotóxicos do que a enzima purificada. Observa-se ainda que, nesse procedimento de extração, não foi usado detergente o que faz com que apenas a fração solúvel da AChE seja extraída. Segundo Viana (2008), esse procedimento de extração é adequado para a finalidade a qual a enzima foi utilizada no presente trabalho e resulta em um extrato enzimático com atividade específica de aproximadamente 1300 U mg^{-1} .

ANEXO 2: Espectro de RMN de ^{13}C do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato**Figura 38:** Espectro de RMN de ^{13}C do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato.

ANEXO 3: Espectro de RMN de ^1H do O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiosfato**Figura 39:** Espectro de RMN de ^1H para o O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiosfato.

ANEXO 4: Porcentagens de inibição da AChE encontradas para as soluções do paration metílico e de alguns de seus subprodutos.

Tabela 27: Porcentagens de inibição da AChE encontradas para as soluções do paration metílico e de alguns de seus subprodutos.

Compostos	<i>p</i> -nitrofenol			O,O-dimetil O- <i>p</i> -hidroxifenil tiofosfato			Paration metílico			Paraoxon metílico		
	^b I	^c M	^d DP	^b I	^c M	^d DP	^b I	^c M	^d DP	^b I	^c M	^d DP
1,00	-8,00	-0,70	7,00	1,00	9,30	9,10	7,00	1,00	8,70	15,0	13,0	6,20
	6,00			19,0			5,00			6,00		
	0,00			8,00			-9,00			18,0		
10,0	7,00	1,70	4,70	11,0	13,7	8,30	45,0	38,7	7,80	20,0	27,7	9,30
	0,00			23,0			41,0			38,0		
	-2,00			7,00			30,0			25,0		
50,0	2,00	5,00	3,60	7,00	11,7	4,20	93,0	93,0	1,00	77,0	69,7	6,70
	9,00			15,0			94,0			68,0		
	4,00			13,0			92,0			64,0		
100	4,00	-2,00	6,60	16,0	21,0	5,60	95,0	94,7	1,50	60,0	71,0	10,5
	-1,00			27,0			93,0			72,0		
	-9,00			20,0			96,0			81,0		
400	6,00	2,30	6,40	12,0	20,7	9,00	94,0	91,0	2,60	96,0	94,7	2,30
	6,00			20,0			89,0			92,0		
	-5,00			30,0			90,0			96,0		

^amg L⁻¹ para o *p*-nitrofenol, O,O-dimetil O-*p*-hidroxifenil tiofosfato e paration metílico e µg L⁻¹ para o paraoxon metílico; ^bPorcentagem de inibição; ^cMédia da porcentagem de inibição; ^dEstimativa do desvio padrão da porcentagem de inibição.

ANEXO 5: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.

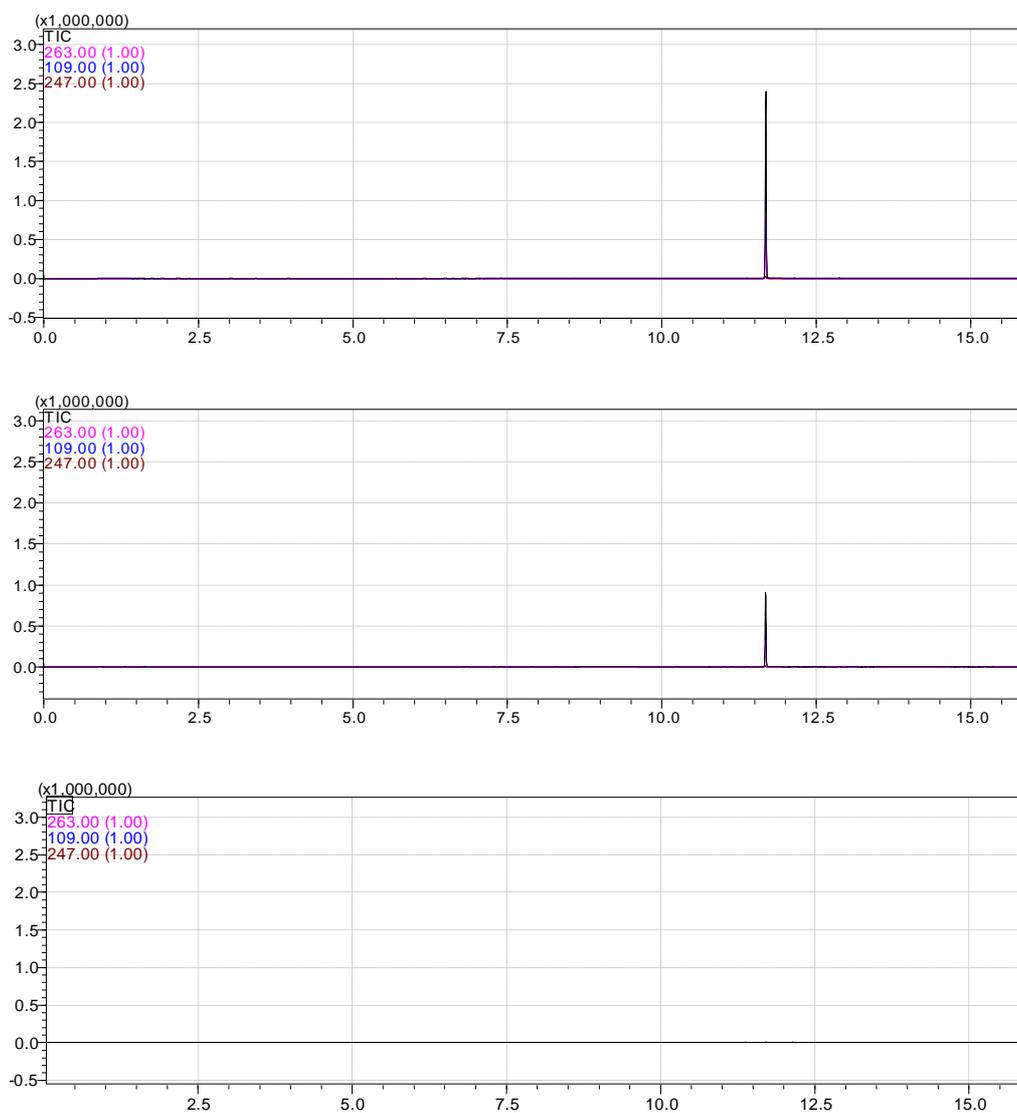


Figura 40: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.

ANEXO 6: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.

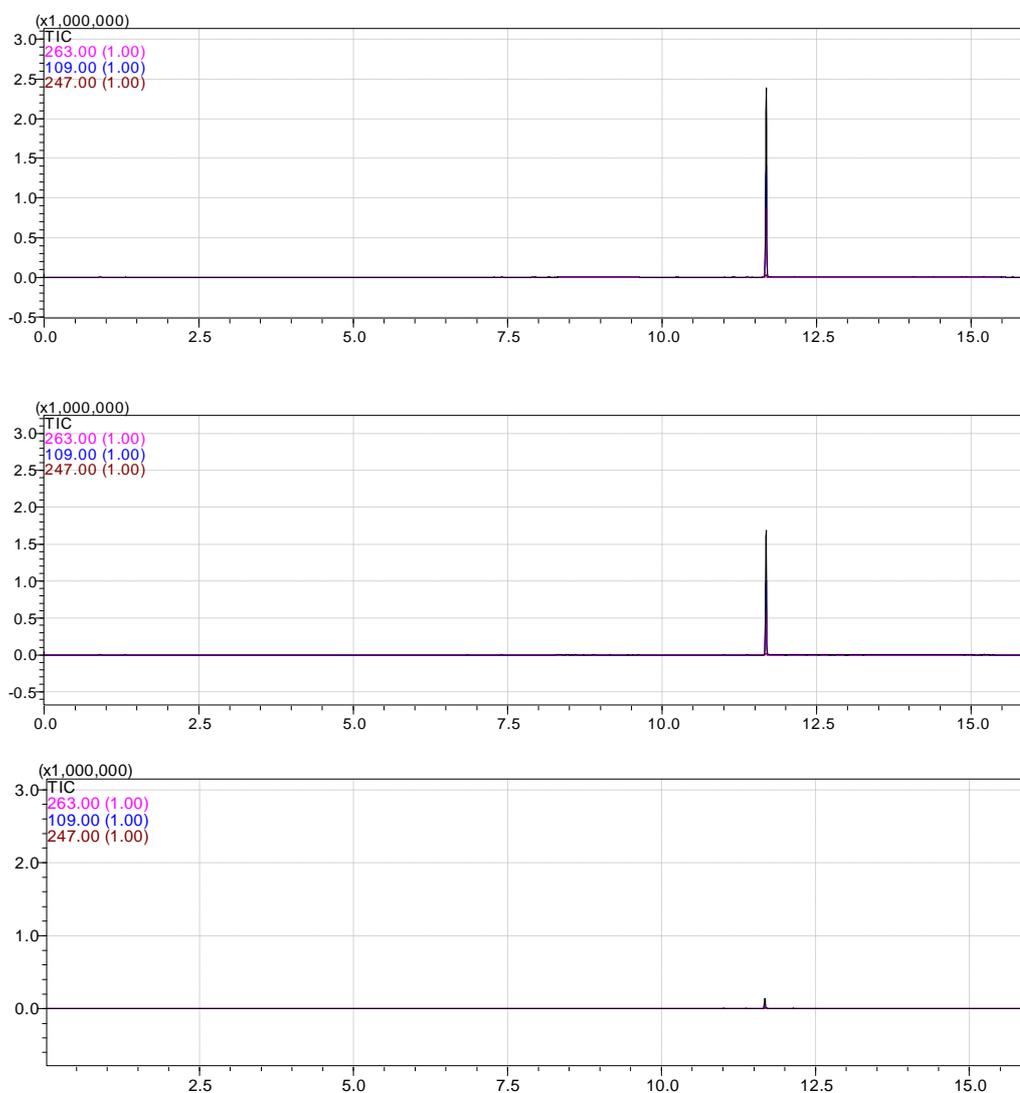


Figura 41: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paration metílico.

ANEXO 7: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.

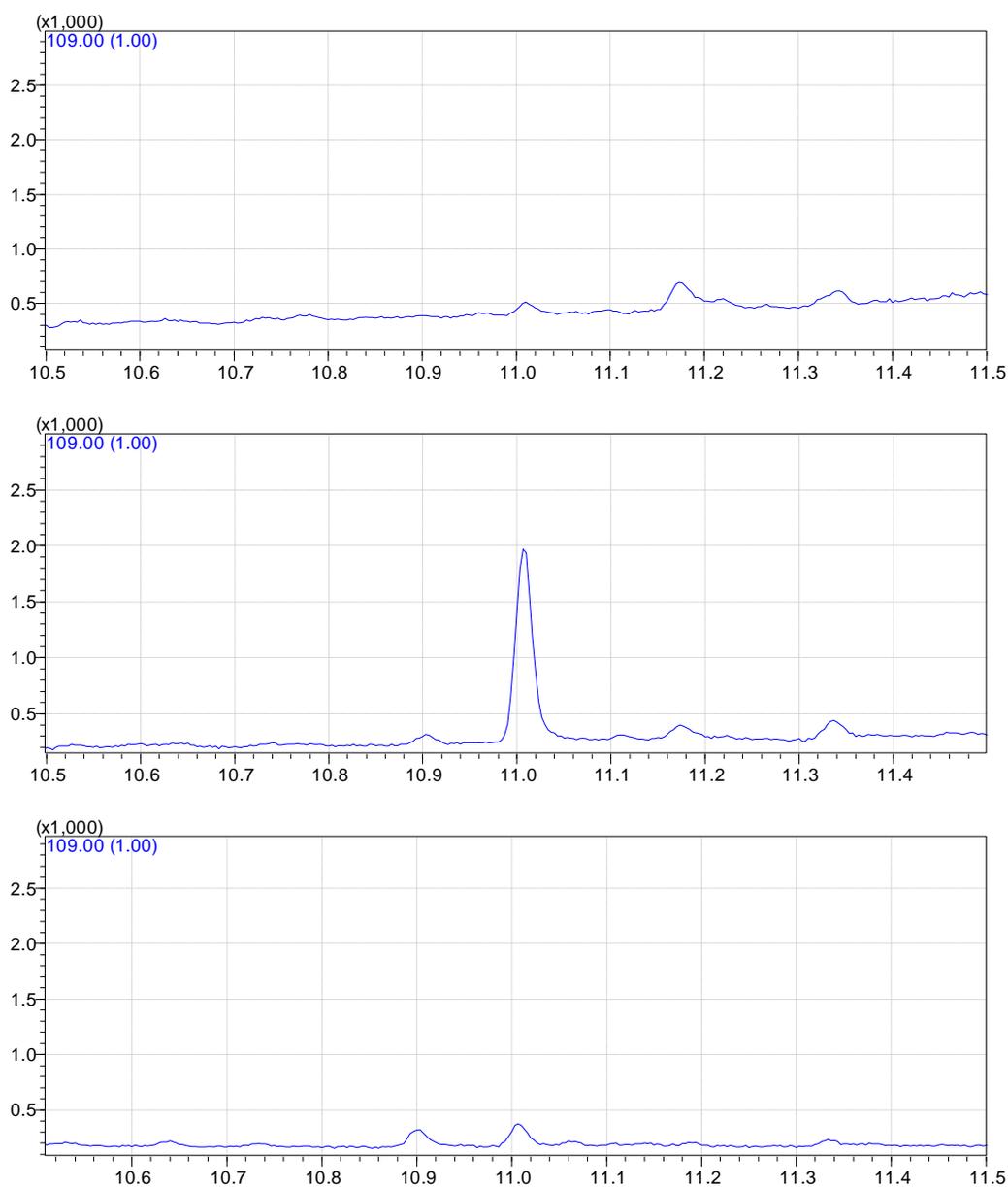


Figura 42: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.

ANEXO 8: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.

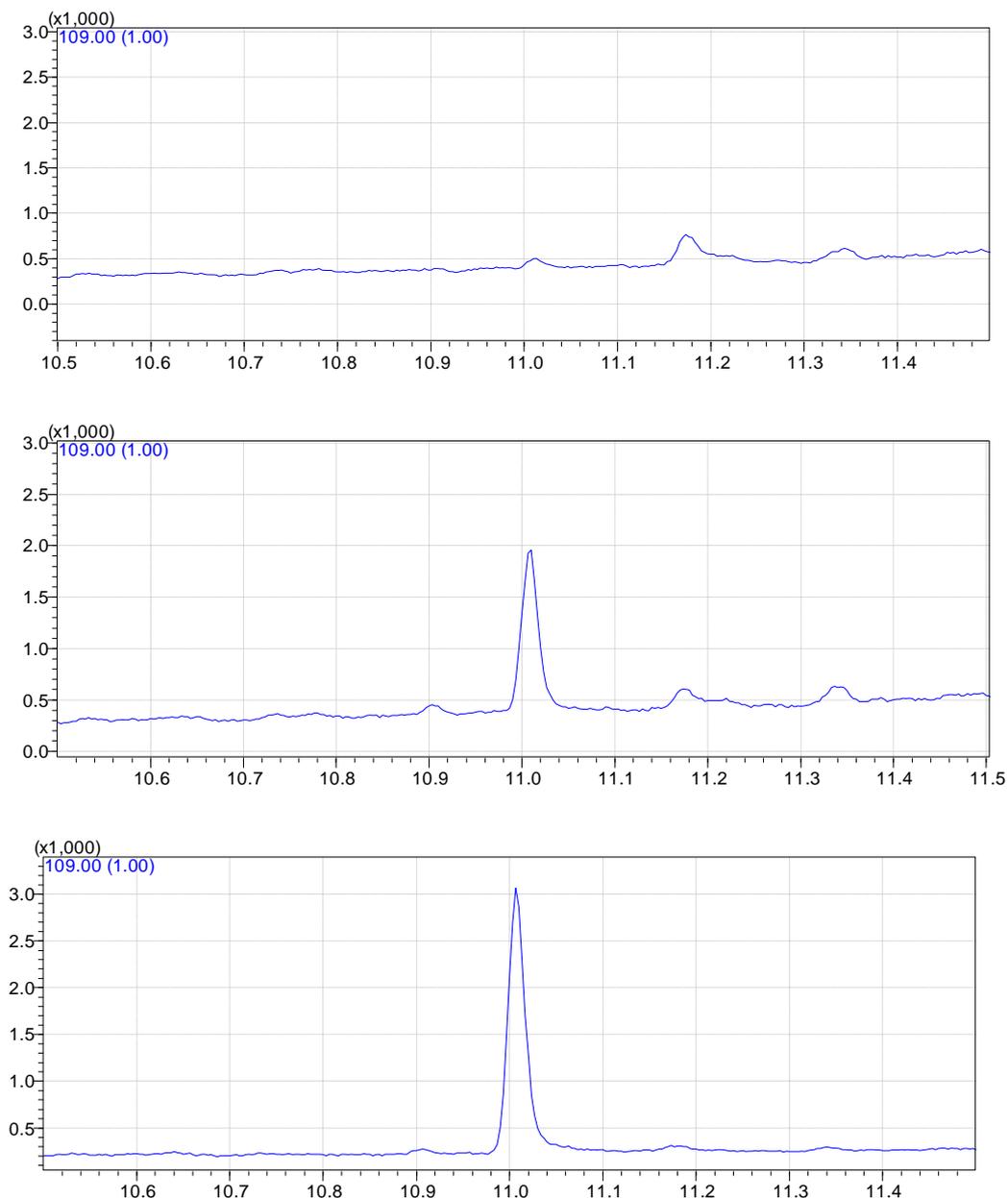


Figura 43: Cromatogramas obtidos a partir de soluções do paration metílico em água ultrapura com ácidos húmicos no tempo inicial e após 15 e 72 dias de exposição – Análise do paraoxon metílico.