

MÉTODO SIMPLIFICADO DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CARBOFURAN E THIODICARB EM SOLO COM A UTILIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA¹

Edson de Oliveira Vieira²
Hélio Teixeira Prates³
Ivan Cruz²
Márcio Mota Ramos⁴
Gilson Fernandes da Silva⁵

RESUMO

Análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência apresentam algumas dificuldades, principalmente no que diz respeito ao elevado custo atribuído à demanda por uma grande quantidade de materiais, solventes e rotinas analíticas extensas. Uma série de tentativas foram feitas no Laboratório de Agroquímica da EMBRAPA-Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG, buscando uma forma simplificada de extração e análise de pesticidas em solo. Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de extração e análise de carbofuran e thiodicarb em solo que reduzisse o custo analítico, com menor tempo de processamento. Para isso, foram aplicados carbofuran e thiodicarb em Latossolo Vermelho-Escuro, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg dm⁻³. Os inseticidas foram quantificados pela técnica do padrão externo e a taxa de recuperação foi de 95 a 110%, com ambos os produtos. O uso da metodologia simplificada mostrou-se perfeitamente satisfatório, não comprometendo a qualidade da análise.

Palavras-chaves: inseticida, análise de pesticidas em solo.

¹ Aceito para publicação em 10.07.2001.

² Núcleo de Ciências Agrárias, UFMG. Cx. P. 135, 39404-006 Montes Claros, MG. eovieira@nca.ufmg.br

³ Embrapa Milho e Sorgo. Cx. P. 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG. htprates@cnpms.embrapa.br

⁴ Dep. Engenharia Agrícola, UFV, 36571-000 Viçosa, MG.

⁵ Dep. Engenharia Florestal, UFV, 36571-000 Viçosa, MG.

ABSTRACT

A SIMPLIFIED METHODOLOGICAL PROCEDURE USING HPLC FOR DETERMINATION OF CARBOFURAN AND THIODICARB RESIDUES IN SOIL

Analyses achieved by HPLC present some difficulties, such as the high cost attributed to a great demand of materials, solvents and extensive analytic routines. A simplified methodological procedure was developed for carbofuran and thiodicarb insecticide residue analysis in soil using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to reduce analytical costs. This analysis was carried out at the Agrochemical Laboratory of EMBRAPA-Milho e Sorgo in Sete Lagoas-MG, Brazil. A Dark Red Latosol was fortified with carbofuran and thiodicarb at concentrations of 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg dm⁻³ in three replications. Insecticides were quantified using external standard method. Recovery for both products ranged from 95 to 110 %. The simplified methodology was found to be satisfactory, considering analysis quality.

Key words: insecticide, pesticide analysis in soil.

INTRODUÇÃO

A aplicação de agroquímicos é uma tecnologia de suma importância no controle de organismos vivos indesejáveis em áreas cultivadas. Desde que corretamente aplicados, a utilização de inseticidas, fungicidas, nematicidas e herbicidas, entre outros biocidas, representa, hoje, uma alternativa de controle de pragas, doenças e ervas daninhas nas lavouras.

Entretanto, as preocupações com a deterioração da qualidade do meio ambiente têm aumentado. Esse fato tem levado à busca de métodos alternativos de exploração agrícola mais racional, ou seja, a adoção de uma agricultura sustentável. O conhecimento do comportamento dos agroquímicos no ambiente, particularmente no sistema água-solo, em condições tropicais, tem-se tomado fundamental para o desenvolvimento de sistemas agrícolas de maior sustentabilidade.

A detecção de pesticidas no ambiente, segundo Meyer e Thurman (6), pode ser realizada por diversos métodos analíticos, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa, imunoenaios e fluorimetria, de acordo com as propriedades químicas de cada molécula que se pretende estudar. Outro método que tem apresentado sucesso são os bioensaios, que consistem numa técnica de detecção de agroquímicos utilizando organismos indicadores (8, 11).

No Brasil, há carência de informações relacionadas ao comportamento de pesticidas em solos tropicais (9), sendo a maioria dos trabalhos nessa área realizados em solos americanos, onde há predominância de argila 2:1 e as condições climáticas são diferentes. A análise de resíduo de pesticidas em solos não é hoje uma rotina nos

laboratórios brasileiros, mas deverá ser, a curto prazo, em virtude do grande número de pesquisas sobre o impacto que podem estar causando ao meio ambiente (1, 4, 10). Essas análises, quando realizadas por HPLC, apresentam algumas dificuldades, principalmente no que diz respeito ao elevado custo atribuído à demanda por uma grande quantidade de materiais, solventes e rotinas analíticas extensas.

O carbofuran e o thiodicarb, princípios ativos de vários pesticidas, são largamente utilizados por produtores rurais no tratamento de sementes.

O thiodicarb, utilizado como inseticida e moluscicida sistêmico, pertence ao grupo dos carbamatos, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1. O thiodicarb é hidrolizado por ácidos e álcalis fortes e se degrada pela luz do sol quando em suspensão aquosa. Em vários tipos de solo o thiodicarb é rapidamente degradado em condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas, por hidrólise ou fotólise, sendo o methomyl e methomyl oxime os produtos primários de degradação. Apresenta solubilidade em água de 35 mg/L a 25°C, sendo produto não-corrosivo com meia-vida de três a oito dias. A DL₅₀ é de 0,246 g/kg de peso de mamífero vivo (via oral).

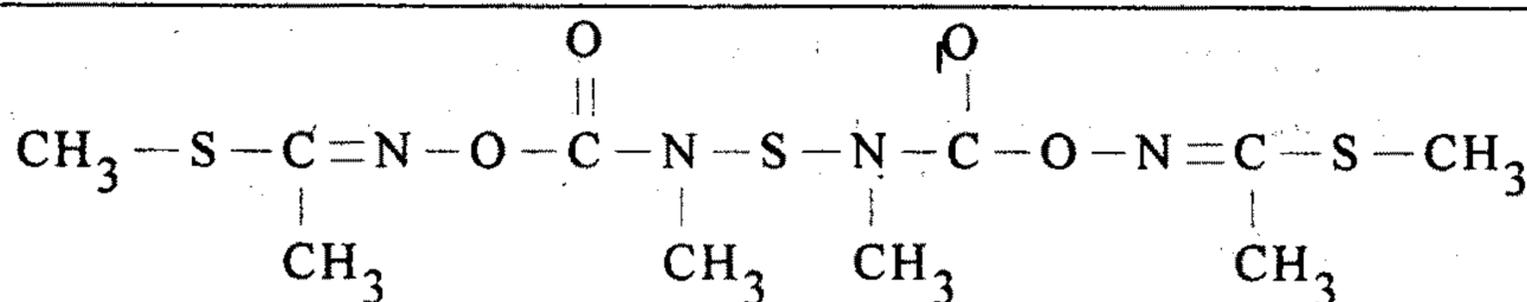


FIGURA 1 - Thiodicarb (3,7,9,13-tetrametil-5,11-dioxa-2,8,14-tritia-4,7,9,12-tetra-azapentadeca-3,12-dieno-6,10-diona) (IUPAC) ou dimetil-N,N'-[tiobis[(metilimino)carboniloxi]]-bis-(etanimidotiato) (CA) (12).

O carbofuran, usado como inseticida, acaricida e nematicida sistêmico, pertence ao grupo dos carbamatos, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 2. Instável em meio alcalino e estável em meio ácido, o carbofuran possui solubilidade em água de 320 mg/L a 25°C e não apresenta corrosividade. Possui meia-vida no solo de 30 a 60 dias e DL₅₀ em torno de 0,02 g/kg de peso de mamíferos vivos, se ingerido via oral. As formulações encontradas no comércio são em forma de granulado e suspensão concentrada para tratamento de sementes.

Tendo em vista o exposta acima, o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia simplificada de extração de carbofuran e

thiodicarb em solo para análise por HPLC, visando minimizar o custo de análise.

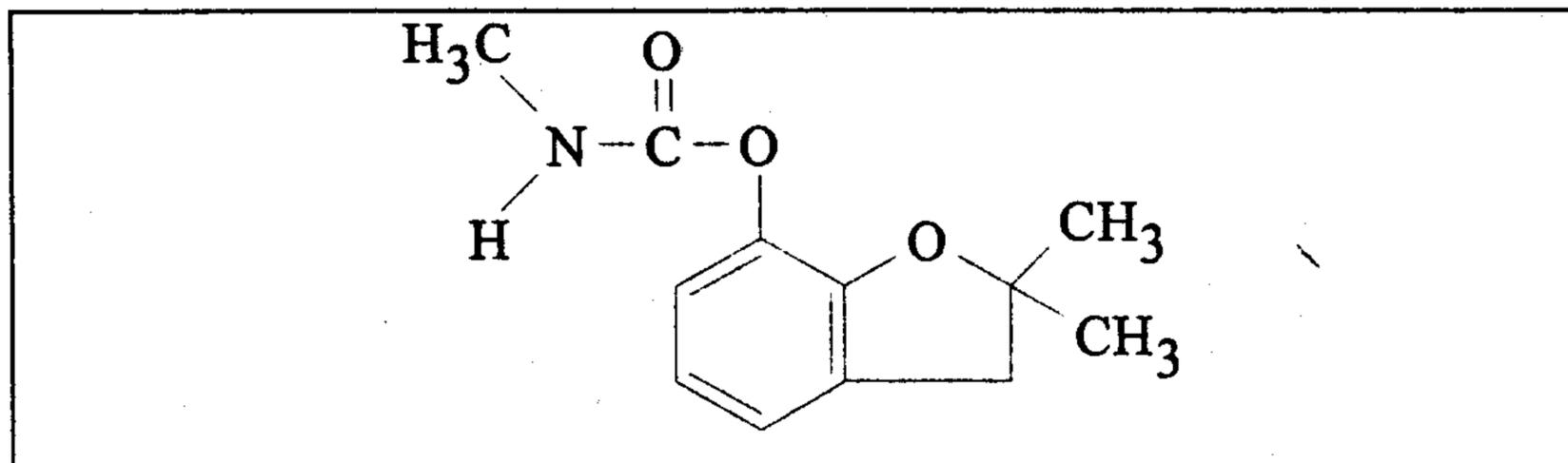


FIGURA 2 - Carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metil carbamato) (IUPAC) ou 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato (CA) (12).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das amostras de solo e fortificação

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de Latossolo Vermelho-Escuro coletadas na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, cujas propriedades físico-químicas, típicas de um solo de cerrado (5), são apresentadas no Quadro 1.

QUADRO 1 - Resultados analíticos médios das características físico químicas do Latossolo Vermelho-Escuro							
Matéria orgânica	pH	CTC a pH 7,0	Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Classificação textural
%		eq.mg/dm ³	-----%				
3,51	5,3	4,38	11	9	20,6	59,4	Argilosa

As amostras de solo foram peneiradas em malha de 2 mm, para remover pedras, raízes e material mais grosseiro, sendo posteriormente retiradas 50 g (peso de matéria seca). Adicionaram-se às amostras de solo soluções de acetonitrila contendo diferentes concentrações de carbofuran ou thiodicarb, sendo utilizadas 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg dm⁻³ com três repetições para cada concentração.

Foi utilizado, para as análises de resíduo, o cromatógrafo líquido (HPLC), marca Shimadzu, modelo Class-LC10, com detector de ultravioleta, modelo SPD-10A e coluna C-18, modelo Zorbax ODS (4,6 mm x 25 cm), marca DuPont, com porosidade de 5 µm.

Os princípios ativos foram cedidos pela Rhodia Agro Ltda. e FMC.

Para a quantificação do carbofuran e do thiodicarb, utilizou-se a técnica do padrão externo para a calibração do HPLC, a qual consiste em correlacionar a área sob a curva do cromatograma com diferentes concentrações do princípio ativo.

Extração dos resíduos dos inseticidas no solo

Para análise de resíduo dos princípios ativos utilizados procedeu-se à extração dessas substâncias do solo.

a) Metodologia de extração do thiodicarb no solo

Vários métodos de extração foram previamente testados, tanto no Laboratório de Análise de Resíduo da Rhodia, em Paulínea, SP, quanto no Laboratório de Agroquímica da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. Após sucessivas tentativas de adaptação da metodologia de extração do thiodicarb em plantas para solo, como variação da temperatura de evaporação do solvente; variação da proporção água:solvente e acidez da fase móvel; variação da porosidade do elemento de filtro; etc., obteve-se a metodologia proposta.

As amostras de 50 g (peso de matéria seca) foram colocadas em erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados 150 mL de acetonitrila, e submetidas a agitação mecânica por 30 minutos. Logo após, o material foi filtrado a vácuo em filtros de vidro Schleicher & Schull, GF52/C. O filtro foi lavado com mais 50 mL de acetonitrila. Em seguida, o material filtrado foi submetido à evaporação do solvente em evaporador rotatório, a uma temperatura menor ou igual a 45°C, para evitar o risco de decomposição da substância. O resíduo foi recuperado com 3 mL de diclorometano e transferido com uma pipeta de Pasteur para um tubo de ensaio, onde foi evaporado à temperatura ambiente e protegido de luz até a secura total. No momento da análise, o resíduo foi recuperado com 5 mL de fase móvel, sendo homogeneizado em ultrassom e filtrado em filtro de membrana de 0,2 µm Millex (Millipore). Em seguida, a amostra foi injetada no HPLC com auxílio de uma microsseringa.

Para a quantificação pelo HPLC foram utilizados os seguintes parâmetros utilizados no Laboratório da Rhodia Agro Ltda. e adaptados às condições do Laboratório de Agroquímica da Embrapa Milho e Sorgo:

coluna: C-18 modelo Zorbax ODS (4,6 mm x 25 cm), marca DuPont, porosidade de 5 μm ; fase móvel: água:acetonitrila (65:35); vazão: 1 mL/min; volume de injeção: 10 μL ; detector: ultravioleta a 233 nm; e tempo de retenção: cerca de 10 minutos.

b) Metodologia de extração do carbofuran no solo

Foram feitas adaptações da metodologia descrita por Mori et al. (7), a qual foi considerada neste trabalho como metodologia original. Consiste em colocar 50 g de solo seco num erlenmeyer de 300 mL e adicionar 150 mL de acetonitrila, juntamente com 2 mL da solução 0,1 N de AgNO_3 , agitando durante 30 minutos em agitador mecânico. Em seguida, filtrar a mistura por sucção em filtro de fibra de vidro de 25G-4. Lavar o solo retido no filtro com 50 mL de acetonitrila. Misturar os filtrantes e concentrá-los até aproximadamente 20 mL em rotavapor, a uma temperatura $\leq 35^\circ\text{C}$. Transferir o concentrado para um funil de separação de 300 mL e adicionar 150 mL de água destilada, 50 mL de diclorometano e 25 g de KCl. Agitar o funil por 5 minutos e deixá-lo em repouso por 2 minutos, para a separação em duas fases. Separar a fase inferior (diclorometano) e repetir o processo do funil com a fase restante, fase superior, aquosa, com mais 50 mL de diclorometano. Misturar as soluções de diclorometano e levá-las ao rotavapor até a secagem total. Extrair o resíduo com 20 mL de tetracloreto de carbono. Montar uma coluna cromatográfica de 15 x 300 mm contendo 7 g de sílica-gel e 15 mL de tetracloreto de carbono. Drenar o excesso de solvente até este atingir o topo da sílica-gel. Adicionar a solução de tetracloreto de carbono e resíduo à coluna e, em seguida, lavar as paredes com aproximadamente 3 mL de tetracloreto de carbono e 25 mL de n-hexano:acetato de etila (17:3 v/v). Eluir o resíduo do carbofuran com 40 mL de n-hexano:acetato de etila (7:3 v/v) a uma taxa de 1,5 mL/min. Concentrar os eluentes em rotavapor e recuperar os resíduos finais com 5 mL de acetonitrila para análise em HPLC.

A metodologia de Mori et al. (7), como pode ser visto, é muito extensa, necessitando de número e quantidade muito grandes de solventes, demandando também muito tempo, o que tornaria as análises de custo elevado.

Para extração, seguiu-se a mesma marcha de extração do thiodicarb, porém com algumas modificações: para filtragem da mistura solo-acetonitrila foi utilizado filtro Whatman nº 5 e a temperatura do banho-maria durante a evaporação do solvente não foi superior a 35°C .

Na quantificação pela HPLC, foram utilizados os seguintes parâmetros (7): coluna: C-18 modelo Zorbax ODS (4,6 mm x 25 cm), marca DuPont, porosidade de 5 μm ; fase móvel: água:acetonitrila (50:50);

vazão: 1 mL/min; volume de injeção: 10 μ L; detector: ultravioleta a 280 nm; e tempo de retenção: cerca de 5 minutos.

Antes de serem iniciadas as análises de resíduo das amostras coletadas, foi realizado o teste denominado "branco" com amostras de solo coletadas dentro da área experimental. Essa medida visava detectar possíveis resíduos desses mesmos inseticidas que viessem a interferir no resultado final.

Análise Estatística

Para comparar a similaridade dos resultados obtidos pela metodologia simplificada e a metodologia original, foi estimado uma equação de regressão linear simples (modelo $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + e_i$), em que a variável dependente foi a concentração observada e a variável independente a concentração esperada.

Devido ao fato de os dados apresentarem repetições, fez-se necessária a realização de um teste de falta de ajustamento, no delineamento inteiramente casualizado, com o objetivo de averiguar se o modelo de regressão proposto é adequado aos dados em estudo.

Para testar a hipótese de similaridade dos dados por meio do modelo de regressão linear simples, foi utilizada a metodologia citada por Guimarães (3). De acordo com essa metodologia, a não rejeição de H_0 implica que valores observados e esperados são estatisticamente semelhantes, perfazendo uma linha reta, passando pela origem e de declividade igual a 1 (hipótese $H_0: \beta_0 = 0$ e $\beta_1 = 1$ vs. $H_a: \beta_0 \neq 0$ e $\beta_1 \neq 1$).

Ainda, conforme Guimarães (3), outros critérios adotados para avaliar a precisão dos valores esperados baseiam-se na análise de correlação e no erro médio, envolvendo os valores observados e esperados. Assim, optou-se por aceitar os resultados referentes às estimativas como precisos, sempre que o coeficiente de determinação entre valores esperados e observados se situasse acima de 90% e, simultaneamente, os erros médios percentuais dos valores esperados fossem menores que 10%.

A interpretação dos resultados baseou-se, portanto, nas combinações possíveis verificadas no Quadro 2. As estimativas foram consideradas adequadas, quando as comparações fossem coincidentes com os casos 1 e 2. O caso 1 refere-se à condição ideal de estimação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da recuperação das amostras fortificadas com concentrações conhecidas de carbofuran e thiodicarb, juntamente com os valores esperados, são apresentados no Quadro 3. A recuperação de

thiodicarb e carbofuran aplicados no solo variou de 95 a 110% . Esses valores mostraram-se bastante satisfatórios quando comparados com os obtidos por Mori et al. (7), em seis diferentes solos fortificados com 0,1; 1,0; e 10 mg dm⁻³ de carbofuran, obtendo uma recuperação de 91 a 100%.

QUADRO 2 – Combinações possíveis para avaliação da precisão de resultados esperados				
Caso	Teste F	R ²	Erro (%)	
1	n.s.	alto	baixo	
2	n.s.	alto	alto	
3	n.s.	baixo	baixo	
4	n.s.	baixo	alto	
5	sig.	alto	baixo	
6	sig.	alto	alto	
7	sig.	baixo	baixo	
8	sig.	baixo	alto	

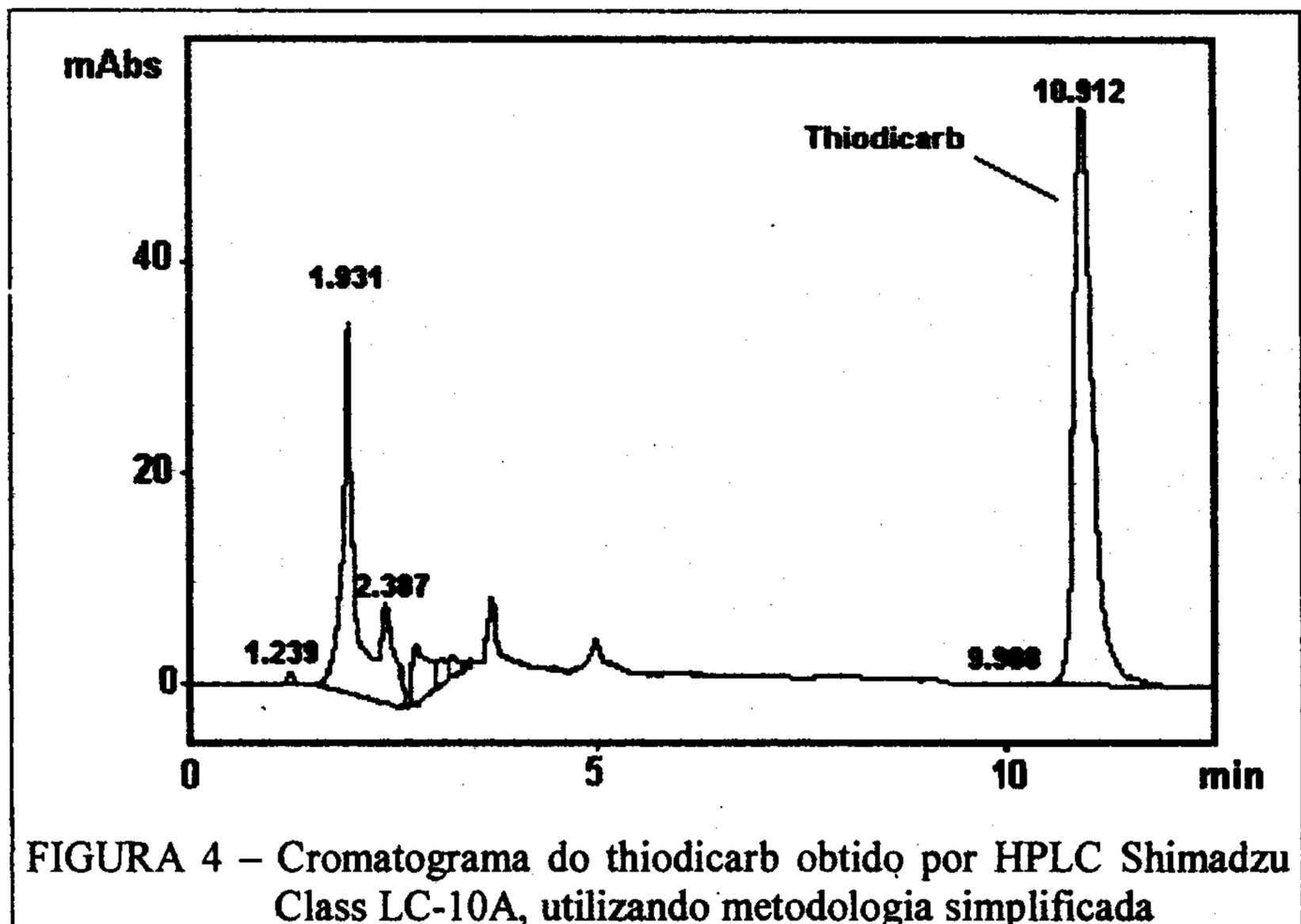
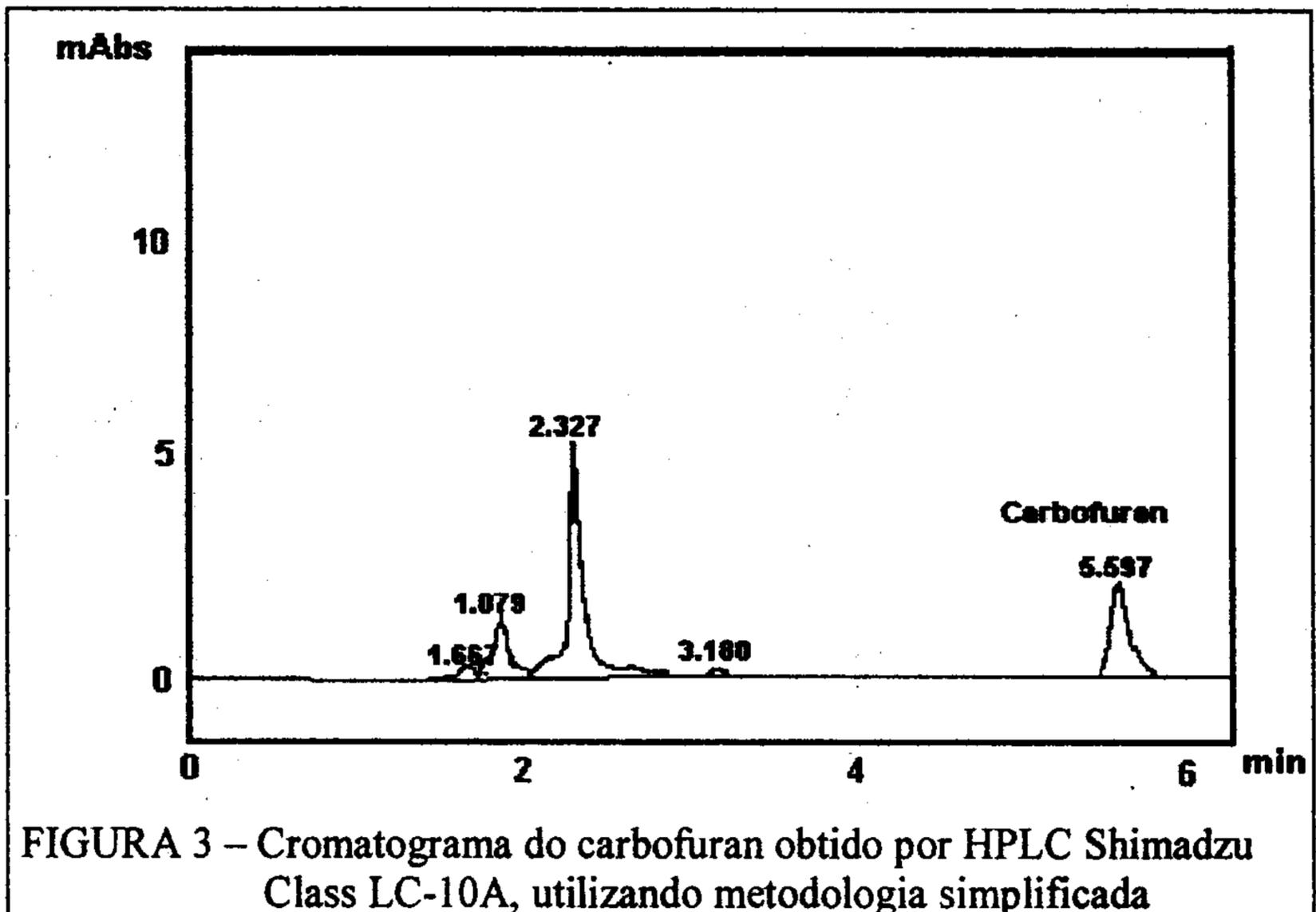
n.s.: não-significativo.

sig.: significativo.

QUADRO 3 - Resultados das médias obtidas utilizando-se a metodologia simplificada de extração de resíduos de carbofuran e thiodicarb no solo			
Carbofuran		Thiodicarb	
Concentração esperada (mg.dm ⁻³)	Concentração média observada (mg.dm ⁻³)	Concentração esperada (mg.dm ⁻³)	Concentração média observada (mg.dm ⁻³)
0,1	0,102	0,1	0,099
0,5	0,494	0,5	0,495
1,0	0,979	1,0	0,995
5,0	5,030	5,0	4,998
10,0	10,015	10,0	9,998

A recuperação é o resultado obtido após a fortificação do solo de quantidades conhecidas do princípio ativo, sendo a sua quantidade detectada pelo HPLC relacionada ao total aplicado.

Os tempos de retenção para a metodologia de extração testada foram de aproximadamente 5,6 e 10,9 min com o carbofuran e o thiodicarb, respectivamente (Figuras 3 e 4), onde se pode observar a ausência de compostos interferentes que pudessem prejudicar a clareza da leitura do pico correspondente aos princípios ativos estudados.



Nos dados obtidos com o carbofuran, de acordo com os resultados apresentados no Quadro 4, pode-se observar que o teste F para falta de ajustamento foi não-significativo, a 1% de probabilidade, indicando que o modelo linear é adequado aos dados em estudo.

QUADRO 4 - Análise de variância da regressão com o teste para a falta de ajustamento, para o carbofuran				
F.V.	G.L	S.Q.	Q.M.	F
Regressão	1	214,4475	214,4475	131346,12**
Falta de ajustamento	3	0,0174	0,0058	3,55 n.s.
Tratamento	(4)	(214,4649)		
Resíduo	10	0,0163	0,00163	

** Significância (1%); ns - não-significativa.

Em razão desse resultado, utilizaram-se os critérios citados por Guimarães (3) para verificar se as condições de linearidade estabelecidas foram atendidas. Os dados observados e esperados mostraram-se estatisticamente coincidentes (Quadro 5), tendo em vista que o teste F foi não-significativo, o coeficiente de determinação situou-se acima de 90% e o erro médio ficou abaixo de 10%. Vale notar que, embora os limites estabelecidos para o coeficiente de determinação e erro médio sejam de valores maiores que 90% e menores que 10%, respectivamente, o coeficiente de determinação obtido para estes dados foi de 99,99% e o erro médio, de 0,038%, ou seja, alto coeficiente de determinação e baixo erro médio, o que contribui para se inferir maior semelhança dos dados.

QUADRO 5 - Testes de validação para comparação entre a metodologia proposta e a metodologia original, testadas para obter as concentrações dos inseticidas carbofuran e thiodicarb			
Caso	Teste F	R ²	Erro (%)
carbofuran	n.s.	99,99	0,038
thiodicarb	n.s.	99,99	0,392

Significância (1%); n.s.: não-significativo.

Nos dados obtidos com o thiodicarb, de acordo com os resultados apresentados no Quadro 6, pode-se observar que o teste F para falta de

ajustamento foi não-significativo, a 1% de probabilidade, indicando que o modelo linear é adequado aos dados em estudo.

QUADRO 6 - Análise de variância da regressão com o teste para a falta de ajustamento, para o thiodicarb				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Regressão	1	213,0241	213,0241	79457,87**
Falta de ajustamento	3	0,0058	0,0019	0,71 n.s.
Tratamento	(4)	(213,0299)		
Resíduo	10	0,0268	0,00268	

**Significância (1%); ns – não-significativa.

Em ambas as metodologias, os dados obtidos pela metodologia simplificada mostraram-se estatisticamente coincidentes, visto que o teste F foi não-significativo, o coeficiente de determinação situou-se acima de 90% e o erro médio ficou abaixo de 10%. Também com o thiodicarb verificou-se coeficiente de determinação alto e erro médio baixo.

CONCLUSÕES

A metodologia testada neste trabalho, visando reduzir a quantidade de materiais, solventes e rotinas analíticas extensas, mostra-se perfeitamente satisfatória, não apresentando quaisquer interferentes que possam comprometer a qualidade da análise. Com os altos valores dos coeficientes de determinação e o baixo erro médio no ajuste de sua curva, verifica-se igualdade estatística do método simplificado, quando comparado com o método denominado original (7).

Considera-se, portanto, a metodologia simplificada proposta como alternativa para a determinação desses princípios ativos no solo estudado.

AGRADECIMENTOS

À Rhodia Ltda., pela utilização de seus laboratórios no início dos procedimentos de adaptação das metodologias utilizadas.

Ao pessoal de apoio da Embrapa Milho e Sorgo.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa, o que possibilitou a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. CHARNAY, M.P. & FOURNIER, J.C. Study of the relation between carbofuran degradation and microbial or physicochemical characteristics of some French soils. *Pesticide Soil*, 40:207-16, 1994.
2. GRAYBILL, S.A. Teory and application of delinear model. Massachusetts, Ouxburg Press, 1976. 704 p.
3. GUIMARÃES, D.P. Desenvolvimento de um modelo de distribuição diamétrica de passo invariante para prognose e projeção da estrutura de povoamentos de eucalipto. Viçosa, UFV, 1994. 160p. (Tese Doutorado).
4. KLADIVKO, E.J.; VAN SCOYOC, G.E.; MONKE, E.J.; OATES, K.M. & PASK, W. Pesticide and nutrient movement into subsurface tile drains on a silt loam soil in Indiana. *Journal Environment Quality*, 20:264-70, 1991.
5. LOPES, A.S. Solos sob cerrado: características, propriedades e manejo. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984. 89p.
6. MEYER, M.T. & THURMAN, E.M. Herbicide metabolites in surface water and groundwater. Washington, American Chemical Society Symposium Series 630, 1995. p. 318.
7. MORI, H.; KOBAYASHI, M. & YAGI, K. A high performace liquid chromatographic method for determination of benfuracarb and carbofuran residues in soil and water. *Journal Pesticide Science*, 12:491-7, 1987.
8. NOVOSEL, K.M.; REMMER, K.A.; KELLS, J. J. & CHOMAS, A.J. Sugarbeet (*Beta vulgaris*) response to and sorption characteristics of nicosulfuron and primisulfuron. *Weed Technology*, 9: 484-9, 1995.
9. RACKE, K.D. Pesticide fate in tropical soils. In: Workshop on Pesticides, Uses and Environmental Safety in Latin America, São Paulo, 1996. Book of Abstracts, SBQ. 1996, p.15.
10. RO, K.S. & CHUNG, K.H. Pesticides and herbicides. *Water Environment Research*, 66: 227-32, 1994.
11. STORK, P. R. Field leaching and degradation of soil applied herbicides in a gradationally texture alkaline soil: chlorsulfuron and triasulfuron. *Aust. J. Agric. Res.*, 46: 1445-58, 1995.
12. TOMLIN, C.A. A world compendium. The pesticide manual incorporating the agrochemical handbook. 10th ed. Surrey, UK, Crop Protection Publications, 1995. 1341p.