

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**SUELEN ANGELI**

**ESTUDO DO PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E DA FOTÓLISE UVC NA  
DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO LORSBAN® COM  
ACOMPANHAMENTO DA ECOTOXICIDADE**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA  
2019**

**SUELEN ANGELI**

**ESTUDO DO PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E DA FOTÓLISE UVC NA  
DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO LORSBAN® COM  
ACOMPANHAMENTO DA ECOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de concentração: Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Dr. Marcus Vinicius de Liz  
Coorientadora: Dra. Adriane Martins de Freitas

CURITIBA  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

Angeli, Suelen

Estudo do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da fotólise UVC na degradação do agrotóxico Lorsban® com acompanhamento da ecotoxicidade [recurso eletrônico] / Suelen Angeli -- 2019.

1 arquivo texto (98 f.): PDF; 1,88 MB

Modo de acesso: World Wide Web

Título extraído da tela de título (visualizado em 12 jun. 2019)

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2019

Bibliografia: p. 78-82

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Produtos químicos agrícolas - Contaminação. 3. Solo - Contaminação. 4. Solos - Poluição. 5. Aedes aegypti. 6. Pesticidas - Avaliação de riscos. 7. Pesticidas - Toxicologia. I. Liz, Marcus Vinícius de. II. Freitas, Adriane Martins de. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

---

CDD: Ed. 23 – 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 124

A Dissertação de Mestrado intitulada: Estudo do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da fotólise UVC na degradação do agrotóxico Lorsban<sup>®</sup> com acompanhamento da ecotoxicidade, defendida em sessão pública pela candidata **Suelen Angeli**, no dia 17 de abril de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

### BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz – Presidente – UTFPR

Profa. Dra. Lúcia Regina Rocha Martins – UTFPR

Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva – UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 17 de abril de 2019.

Dedico este trabalho ao meu marido, por sempre me incentivar e me encorajar a seguir meus sonhos, sem você certamente eu não teria chegado até aqui. Gratidão eterna!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar meus passos, me dar forças e discernimento para superar os obstáculos.

Ao meu orientador, professor Marcus Vinicius de Liz, e a minha coorientadora, professora Adriane Martins de Freitas, por terem me aceitado como orientanda, pela confiança, paciência, amizade e ensinamentos. Imensa gratidão e carinho!

Aos meus pais, por todo o apoio em mim investido e por terem me ensinado a persistir nos meus objetivos. Amo vocês!

Ao meu marido, por 10 anos de companheirismo, amor, incentivo, encorajamento e compreensão pelos momentos de ausência. A conclusão da graduação e do mestrado só se tornaram possíveis porque você esteve ao meu lado!

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) e ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi), pela oportunidade de utilizar suas dependências e a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste estudo.

Ao CNPq pelo recurso oferecido através do projeto de pesquisa “Monitoramento de pesticidas em águas naturais, remediação por processos oxidativos avançados e avaliação da remoção da toxicidade”.

Aos professores Lúcia R. R. Martins, Lucila Adriani Coral e Mário A. Navarro da Silva, por terem aceito o convite para a banca de qualificação e/ou defesa, e por todas as considerações para melhoria deste estudo.

Aos professores Lucila Adriani Coral e Fernando Molin por terem confiado em mim para ser bolsista técnica do Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da UTFPR, e à Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

À Rúbia C. R. Bottini, técnica responsável do LAMAQ, por me acolher tão bem e me ensinar tanta coisa, que é até difícil de encontrar palavras que sejam suficientes para expressar meu carinho por você!

Aos laboratórios multiusuários - Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) e Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) - pela disponibilização dos equipamentos e possibilidade de realização das análises.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE), do Instituto Oswaldo Cruz – RJ, por fornecer os ovos de *Aedes aegypti*.

À Eliane Adams, do laboratório de ecotoxicologia, por toda a ajuda com os bioensaios, você foi parte fundamental deste trabalho.

À Sarah, Emeline, Ana e Bárbara, a amizade de vocês foi indescritível e tornou esta caminhada muito mais agradável. Obrigada pelo apoio, ajuda e carinho nos momentos mais difíceis!

Aos meus colegas do laboratório - Grupo de Pesquisa em Tecnologias Avançadas de Tratamento de Águas e Efluentes (GPTec), Amanda, Andressa, Roberson, Bruno, Fernando, Samara, Marília, Liziê, Gabi e Rafa, obrigada por todo o companheirismo, ajuda, apoio, dicas e risadas. Em especial à Rúbia e à Renata, que mesmo na distância sempre tiveram paciência para me ajudar, seja por mensagem, foto ou vídeo. Muito obrigada!

À melhor colega de quarto do mundo, Karen, você foi um anjo escolhido por Deus para compartilhar comigo estes dois anos. Sou tão grata por ter te conhecido! Sua companhia tornava meus dias mais leves e tranquilos. Não sei como agradecer por seus abraços apertados quando meu coração já não aguentava mais de saudade de casa. Saiba que sempre poderá contar comigo!

À todos que de alguma forma me incentivaram e ajudaram a desenvolver este trabalho, muito obrigada!

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*(José de Alencar)*

## RESUMO

ANGELI, Suelen. **Estudo do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da fotólise UVC na degradação do agrotóxico Lorsban® com acompanhamento da ecotoxicidade.** 98 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Resíduos de agrotóxicos estão entre os principais estressores de ecossistemas aquáticos, devido ao uso indiscriminado destes compostos, os quais representam uma séria ameaça à biota, e, também, à saúde humana, visto que a maioria são tóxicos, mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos. Por consequência da recalcitrância dos agrotóxicos, diversas tecnologias de remediação têm sido investigadas. Neste trabalho buscou-se avaliar a eficácia de degradação do Lorsban®, princípio ativo clorpirifós (CP), por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, juntamente com a realização de bioensaios para avaliar a ecotoxicidade das soluções, pré e pós tratamento. As degradações foram realizadas em reator de bancada com capacidade de 600 mL, utilizando como fonte de radiação uma lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio de 125 W, mergulhada na solução, e protegida por bulbo de quartzo. Nos testes de degradação, a concentração inicial do CP foi de 200 µg L<sup>-1</sup>, sendo geradas amostras em 30, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos, para serem analisadas por HPLC-DAD e testes de ecotoxicidade. Para as análises cromatográficas utilizou-se a extração líquido-líquido (ELL). O limite de quantificação (LQ) do método cromatográfico foi de 0,06 µg L<sup>-1</sup>, e o limite de detecção (LD) 0,02 µg L<sup>-1</sup>. Para os ensaios ecotoxicológicos foram utilizados três organismos-teste, *Daphnia magna*, sementes de *Lactuca sativa* e larvas de *Aedes aegypti*. Após 60 minutos de tratamento, em ambos os processos, o CP não foi mais observado cromatograficamente (<LD), correspondendo a uma degradação superior a 99,99%. Para as amostras testadas por *D. magna*, verificou-se uma redução na imobilidade dos organismos somente em 480 minutos pelo processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto na fotólise UVC, observou-se 100% de imobilidade até 90 minutos de tratamento, havendo oscilação dos resultados a partir desse tempo. Para as sementes de *L. sativa*, o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou inibição do crescimento das radículas nos tempos de 60 e 240 minutos, enquanto nas demais amostras o efeito não foi significativo, e, na fotólise UVC não foi observado nenhum efeito significativo em nenhum dos tempos avaliados. Em relação aos testes com *A. aegypti*, nos tempos de 60, 90, 120 e 480 minutos não houve imobilidade dos organismos no processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já na fotólise UVC, não foi observada imobilidade de 60 minutos em diante. Portanto, mesmo atingindo altas taxas de degradação do CP, em ambos os processos, os bioensaios demonstraram a importância das análises do efluente gerado após as degradações, para que seja feita uma avaliação profunda, e mais consciente, sobre a eficiência e a viabilidade dos tratamentos propostos.

**Palavras-chave:** Pesticidas. Clorpirifós. Processos avançados de oxidação. HPLC-DAD. Bioensaios.

## ABSTRACT

ANGELI, Suelen. **Study of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process and the UVC photolysis in the degradation of the Lorsban<sup>®</sup> agrotoxic with ecotoxicity monitoring.** 98 p. Dissertation. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2019.

Agrochemical waste is among the main stressors of aquatic ecosystems due to the indiscriminate use of these compounds, which represent a serious threat to biota, and also to human health, since most are toxic, mutagenic, teratogenic or carcinogenic. As a consequence of the recalcitrance of agrochemicals, several remediation technologies have been investigated. This work aimed to evaluate the degradation efficiency of Lorsban<sup>®</sup>, active chlorpyrifos (CP), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process and UVC photolysis, together with bioassays to evaluate the ecotoxicity of solutions, pre and post treatment. The degradations were carried out in a 600 mL reactor using a high pressure mercury vapor lamp of 125 W, immersed in the solution and protected by a quartz bulb. In the degradation tests, the initial CP concentration was 200 µg L<sup>-1</sup>, and samples were generated at 30, 60, 90, 120, 240, 360 and 480 minutes for analysis by HPLC-DAD and ecotoxicity tests. Liquid-liquid extraction (ELL) was used for the chromatographic analyzes. The limit of quantification (LQ) of the chromatographic method was 0.06 µg L<sup>-1</sup>, and the limit of detection (LD) was 0.02 µg L<sup>-1</sup>. For the ecotoxicological tests three test organisms, *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* seeds and *Aedes aegypti* larvae were used. After 60 minutes of treatment, CP was no longer observed (<LD), corresponding to a degradation higher than 99.99%. For the samples tested by *D. magna*, a reduction in the immobility of the organisms was observed only in 480 minutes by the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, whereas in the UVC photolysis 100% immobility was observed up to 90 minutes of treatment, with oscillation of the results from that time. For *L. sativa* seeds, the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process showed inhibition of root growth at 60 and 240 minutes, while in the other samples the effect was not significant, and in UVC photolysis no significant effect was observed in any of the evaluated times. Regarding the tests with *A. aegypti*, at 60, 90, 120 and 480 minutes times, there was no immobility of the organisms in the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, and in the UVC photolysis no immobility was observed from 60 minutes onwards. Therefore, even reaching high CP degradation rates, in both processes, the bioassays demonstrated the importance of the analyzes of the effluent generated after the degradations, in order to make a deep and more conscious evaluation of the efficiency and viability of the treatments proposed.

**Key-words:** Pesticides. Chlorpyrifos. Advanced oxidation processes. HPLC-DAD. Bioassays.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 -	Consumo de agrotóxicos no Brasil entre 2000 e 2017.....	18
Figura 2 -	Fórmula estrutural do clorpirifós.....	19
Figura 3 -	Principais subprodutos de degradação do clorpirifós.....	21
Figura 4 -	Demonstração da dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente.....	23
Figura 5 -	Exemplos de processos avançados de oxidação.....	27
Figura 6 -	<i>Daphnia magna</i> , amplamente utilizada em bioensaios.....	33
Figura 7 -	Exemplo de bioensaio realizado com sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	34
Figura 8 -	Larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> utilizadas em bioensaio.....	36
Figura 9 -	Fluxograma representativo das etapas realizadas neste trabalho...	37
Figura 10 -	Esquema do reator fotoquímico de bancada equipado com radiação artificial.....	39
Figura 11 -	Equação de regressão para verificação do método cromatográfico	46
Figura 12 -	Cromatograma tridimensional do CP, CPO e TCP em água e 0,2% de acetonitrila (eluição 90:10 de ACN:H <sub>2</sub> O, vazão 0,4 mL min <sup>-1</sup> e monitoramento em 290 nm).....	47
Figura 13 -	Espectro UV do CP (em água e 0,2% de acetonitrila, eluição 90:10 de ACN:H <sub>2</sub> O e vazão 0,4 mL min <sup>-1</sup> ).....	47
Figura 14 -	Espectros UV do CPO e TCP (em água e 0,2% de acetonitrila, eluição 90:10 de ACN:H <sub>2</sub> O e vazão 0,4 mL min <sup>-1</sup> ).....	48
Figura 15 -	Cromatogramas de degradações do Lorsban <sup>®</sup> por processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (eluição 90:10 de ACN:H <sub>2</sub> O, vazão 0,4 mL min <sup>-1</sup> e monitoramento em 290 nm). Concentração de clorpirifós: (a) 200 µg L <sup>-1</sup> ; (b) 3,51 µg L <sup>-1</sup> ; (c)-(h) <LD.....	50
Figura 16 -	Cromatogramas de degradações do Lorsban <sup>®</sup> por fotólise UVC (eluição 90:10 de ACN:H <sub>2</sub> O, vazão 0,4 mL min <sup>-1</sup> e monitoramento em 290 nm). Concentração de clorpirifós: (a) 200 µg L <sup>-1</sup> ; (b) 1,65 µg L <sup>-1</sup> ; (c)-(h) <LD.....	56
Quadro 1 -	Categorias de agrotóxicos e seus respectivos organismos-alvo....	16
Quadro 2 -	Condições do método cromatográfico estabelecido para detecção e quantificação do clorpirifós em água com 0,2% de acetonitrila.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração residual de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> do processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	48
Tabela 2 -	Tempo de retenção aproximado dos subprodutos de degradação do Lorsban <sup>®</sup> , de em ambos os processos de tratamento (UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e fotólise UVC).....	60
Tabela 3 -	Resultado dos testes de ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> e amostras de Lorsban <sup>®</sup> após processos UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	63
Tabela 4 -	Resultado dos testes de ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> e amostras de Lorsban <sup>®</sup> após tratamentos por fotólise UVC.....	64
Tabela 5 -	Valores de CE <sub>50</sub> relatados na literatura para a espécie <i>Daphnia</i> , em testes de toxicidade aguda.....	66
Tabela 6	Resultado dos testes de fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> e amostras de Lorsban <sup>®</sup> após processos UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	68
Tabela 7 -	Resultado dos testes de fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> e amostras de Lorsban <sup>®</sup> após tratamentos por fotólise UVC.	68
Tabela 8 -	Resultado dos testes de atividade larvívica com <i>Aedes aegypti</i> e amostras de Lorsban <sup>®</sup> após processos UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	71
Tabela 9 -	Resultado dos testes de atividade larvívica com <i>Aedes aegypti</i> e amostras de Lorsban <sup>®</sup> após tratamentos por fotólise UVC.....	72
Tabela 10 -	Resultados compilados dos tratamentos realizados com amostras de Lorsban <sup>®</sup> .....	74

## LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOPs	<i>Advanced Oxidation Processes</i>
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CONSEA	Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional
ELL	Extração líquido-líquido
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GC-MS/MS	<i>Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry</i>
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector</i>
HPLC-UV	<i>High Performance Liquid Chromatography with UV detection</i>
MCPA	Sal dimetilamina do ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético
NBR	Norma Brasileira
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PS	Persulfato
PTFE	Politetrafluoretileno
VMP	Valor Máximo Permitido

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
3.1	AGROTÓXICOS.....	15
3.1.1	Clorpirifós.....	19
3.1.2	Agrotóxicos e o meio ambiente.....	22
3.2	PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO.....	25
3.2.1	Processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	28
3.3	FOTÓLISE.....	29
3.4	DEGRADAÇÃO DE AGROTÓXICOS POR AOPs.....	29
3.5	BIOENSAIOS.....	31
3.5.1	<i>Daphnia magna</i> .....	33
3.5.2	<i>Lactuca sativa</i> .....	34
3.5.3	<i>Aedes aegypti</i> .....	35
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	37
4.2	REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	38
4.2.1	Soluções estoque de CP, CPO e TCP para análise cromatográfica.....	38
4.2.2	Solução estoque de Lorsban® para os ensaios de degradação.....	39
4.3	ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO.....	39
4.3.1	Determinação do peróxido de hidrogênio residual.....	40
4.3.2	Extração líquido-líquido.....	41
4.3.3	Análise quantitativa do clorpirifós por HPLC-DAD.....	42
4.4	BIOENSAIOS.....	43
4.4.1	Ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	43
4.4.2	Fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	44
4.4.3	Atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> .....	45
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	46
5.1	VERIFICAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	46
5.2	DEGRADAÇÃO DO LORSBAN® POR PROCESSO UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	48
5.3	DEGRADAÇÃO DO LORSBAN® POR FOTÓLISE UVC.....	55
5.4	BIOENSAIOS.....	63
5.4.1	Ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	63
5.4.2	Fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	67
5.4.3	Atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> .....	70
5.4.4	Considerações sobre os resultados cromatográficos e bioensaios.....	73
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	76
7	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
	<b>ANEXO A</b> .....	93
	<b>ANEXO B</b> .....	94
	<b>ANEXO C</b> .....	95
	<b>ANEXO D</b> .....	97
	<b>ANEXO E</b> .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

Os micropoluentes lançados no meio ambiente têm sido reportados como contaminantes emergentes, dentre eles podem ser citados os produtos farmacêuticos, de higiene pessoal, aditivos industriais, hormônios, agrotóxicos, entre outros (PARKER et al., 2017; ROUSIS et al., 2017). Mesmo sendo encontrados em baixas concentrações, na ordem de ng a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a grande diversidade e disposição contínua destes representa uma séria ameaça, principalmente à qualidade da água, seja superficial, de aquíferos ou subterrânea (KLAMERTH et al., 2013; LUO et al., 2014).

Dentre os contaminantes supracitados, os agrotóxicos são classificados com o maior grau de periculosidade, visto seus efeitos deletérios (KIM; KABIR; JAHAN, 2017; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013). Há indicativos na literatura de que a saúde humana pode ser afetada após meses, anos ou décadas, decorrente da exposição e/ou consumo de agrotóxicos que provêm de diversas rotas, tais como alimento ou água potável que contenha resíduos destas substâncias (RANGEL; ROSA; SARCINELLI, 2011).

Estudos revelam um aumento anual de resíduos de agrotóxicos em alimentos, solo, atmosfera, precipitações secas e úmidas, águas superficiais e subterrâneas (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014; MORILLO; VILLAVARDE, 2017). Tendo em vista os relatos da presença de agrotóxicos em diferentes fontes de água, por exemplo, em águas superficiais, córregos e águas subterrâneas, corpos de água doce (rios, lagos e estuários), inclusive em água potável e em água mineral, percebe-se a necessidade de controle e remediação destes compostos (CCANCCAPA et al., 2016; DI GUARDO; FINIZIO, 2018; LE COADOU et al., 2017; MCKNIGHT et al., 2015; PALMA et al., 2014; YADAV et al., 2015).

Visto que os processos convencionais de tratamento de água foram inicialmente planejados para remoção de sólidos, matéria orgânica e microorganismos patogênicos, percebe-se que não houve um planejamento para remoção de contaminantes emergentes. Dito isto, em conjunto com a pressão exacerbada sobre os recursos hídricos devido ao crescimento populacional, deterioração das fontes naturais de água, uso em larga escala de produtos químicos, e criação incessante de novos compostos, torna-se necessária a adoção de tecnologias alternativas de

tratamento (ALALM; TAWFIK; OOKAWARA, 2015; DUTTA et al., 2015; TEODOSIU et al., 2018).

Levando em consideração estes fatos, diversos estudos sugerem os processos avançados de oxidação, do inglês *Advanced Oxidation Processes* (AOPs), como uma alternativa, visto a baixa seletividade e o alto poder oxidante, bem como da possibilidade de mineralização dos compostos, produzindo CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, íons inorgânicos ou substâncias menos recalcitrantes (FUNAI et al., 2017; GOZZI et al., 2017; LOPEZ-ALVAREZ et al., 2016; SHARMA; AHMAD; FLORA, 2018).

Na literatura encontra-se diversos estudos de tratamento de agrotóxicos por AOPs, contudo, existem poucos registros destes tratamentos na degradação do agrotóxico clorpirifós, principalmente relacionando determinado tratamento com o acompanhamento da ecotoxicidade do efluente gerado. Normalmente, é avaliado apenas a redução da concentração do agrotóxico, no entanto, a possível formação de subprodutos pode gerar toxicidade mais elevada do que a apresentada pelo composto inicial (STARLING et al., 2019; TIWARI; GUHA, 2014).

Entre os estudos que avaliaram a degradação do clorpirifós (CP), e realizaram o acompanhamento da toxicidade, estão os trabalhos de Utzig (2016) e Lima (2017). Nestes trabalhos foram avaliadas as degradações do agrotóxico clorpirifós (padrão analítico) e da solução comercial do composto (Lorsban<sup>®</sup>), utilizando uma lâmpada posicionada externamente ao reator, alocada a 10 cm da borda, com a finalidade de abrandar os processos de tratamento para monitorar a degradação do CP, juntamente com ensaios de ecotoxicidade.

Percebeu-se então a necessidade de realizar novos estudos de degradação, porém, com a lâmpada mergulhada na solução a ser tratada, a fim de potencializar os processos de tratamento, e obter um melhor rendimento da degradação, bem como buscar a diminuição da ecotoxicidade ao longo dos tratamentos.

Diante deste panorama, neste estudo foram realizados testes de degradação do agrotóxico comercial Lorsban<sup>®</sup>, por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, com a lâmpada mergulhada na solução a ser tratada. A cromatografia a líquido acoplada a detector de arranjo de diodos foi utilizada para acompanhar a degradação do CP, e a formação de subprodutos durante os processos de tratamento. Concomitante às degradações, foram realizados bioensaios com *Daphnia magna*, sementes de *Lactuca sativa* e larvas de *Aedes aegypti*, para verificar a toxicidade das amostras geradas no decorrer dos processos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a degradação do agrotóxico comercial Lorsban<sup>®</sup> (clorpirifós), por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, acompanhando sua eficiência por HPLC-DAD e ensaios de ecotoxicidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudos de degradação do agrotóxico comercial Lorsban<sup>®</sup>, em reator de bancada, através do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da fotólise UVC, ao longo de 8 horas, nos tempos pré-determinados de 0, 30, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos;
- Determinar a concentração residual do princípio ativo clorpirifós (CP) e verificar a formação dos subprodutos, do CP e dos constituintes do Lorsban<sup>®</sup>, por meio da cromatografia a líquido acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), nos tempos pré-determinados;
- Avaliar a ecotoxicidade aguda, pré e pós tratamento do agrotóxico Lorsban<sup>®</sup>, com três organismos-teste, *Daphnia magna*, sementes de *Lactuca sativa* e larvas de *Aedes aegypti*, nos tempos pré-determinados.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 AGROTÓXICOS

Antes de 1980 era comum a menção aos agrotóxicos empregando o termo defensivo agrícola, uma designação dissimulada sobre a natureza nociva destes compostos, onde fazia-se inferência à defesa do plantio, ao mesmo tempo que se acobertava a periculosidade dos mesmos, sobre a saúde humana e o meio ambiente. No entanto, após intensos debates, em 1980, no Rio Grande do Sul, criou-se uma legislação estadual sobre o uso e o registro de venenos agrícolas. Posteriormente foi promulgada em âmbito federal a Lei 7.802/89, designando enfim, tais produtos como agrotóxicos, que compreendem por sua vez diferentes classes de uso (DOSSIÊ ABRASCO, 2015). Perante esta mesma lei os agrotóxicos são assim retratados (BRASIL, 1989):

a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Entretanto, a origem destes compostos advém de tempos anteriores, mais precisamente da Segunda Guerra Mundial, com a descoberta do inseticida organoclorado DDT (1939), que chegou ao Brasil em 1943, e a partir de então, esta data é referenciada como um marco da cultura agrícola (SPADOTTO, 2004).

A utilização dos agrotóxicos se intensificou no final de 1940 com a Revolução Verde, nos Estados Unidos, já no Brasil teve seu crescimento em meados de 1960, com o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA). Ambos os programas buscavam a modernização da agricultura, com base tecnológica em insumos, e técnicas mais avançadas de irrigação e mecanização. Com estas novas políticas agrícolas houve um aumento significativo no uso destes produtos (BARBOSA, 2016).

Os agrotóxicos são compostos de diferentes propriedades físico-químicas, alguns são seletivos e apenas aplicados contra certas espécies-alvo, enquanto outros são completamente não-seletivos e, portanto, eficazes para quase todas as espécies-alvo. De acordo com seus organismos-alvo, os agrotóxicos são classificados em categorias, tais como herbicidas, inseticidas, fungicidas, nematicidas, avicidas, rodenticidas, desfoliantes, dessecantes, entre outros (VAGI; PETSAS, 2019).

Baseado na estrutura química, os agrotóxicos são categorizados como organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazinas, cloroacetanilidas, e outros. No seu modo de ação atuam como inibidores de fotossíntese, inibidores de aminoácidos, reguladores de crescimento, inibidores de metabolismo e demais ações (VAGI; PETSAS, 2019).

Na composição destes produtos há substâncias tóxicas, as quais são responsáveis por prevenir, destruir ou controlar qualquer espécie indesejada, mas a diversidade dos agrotóxicos existente é fundamentada em seus diferentes modos de ação, composição e atuação sobre os mais variados organismos, por exemplo, insetos, moluscos, plantas, fungos, entre outros (descritos no Quadro 1) (COLLOTTA; BERTAZZI; BOLLATI, 2013; REDDY; KIM, 2015).

**Quadro 1 - Categorias de agrotóxicos e seus respectivos organismos-alvo.**

Agrotóxicos	Organismos-alvo
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Aves
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas
Nematicida	Nematóides
Moluscicida	Moluscos
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores
Fumigante	Bactérias do solo
Ovicidas	Ovos de insetos

Fonte: Adaptado de Gomes Junior (2017).

Atualmente os agrotóxicos são utilizados em diversos setores, dentre eles, produção de flores, tratamento de madeira, armazenamento de sementes, entre outros, no entanto, o maior setor de consumo destes compostos é o agropecuário (SANTANA et al., 2016), aproximadamente 80% dos agrotóxicos utilizados no mundo são destinados para fins agrícolas, enquanto que o restante é dedicado ao controle de pragas estruturais e de saúde pública (MUTURI et al., 2017).

Há indicativos na literatura de que a saúde pode ser afetada após meses, anos ou décadas, decorrente da exposição e/ou consumo de agrotóxicos, que provêm de diversas rotas, seja por alimento ou água potável que contenha resíduos destas substâncias, seja por inalação ou contato dérmico com tais produtos (RANGEL; ROSA; SARCINELLI, 2011).

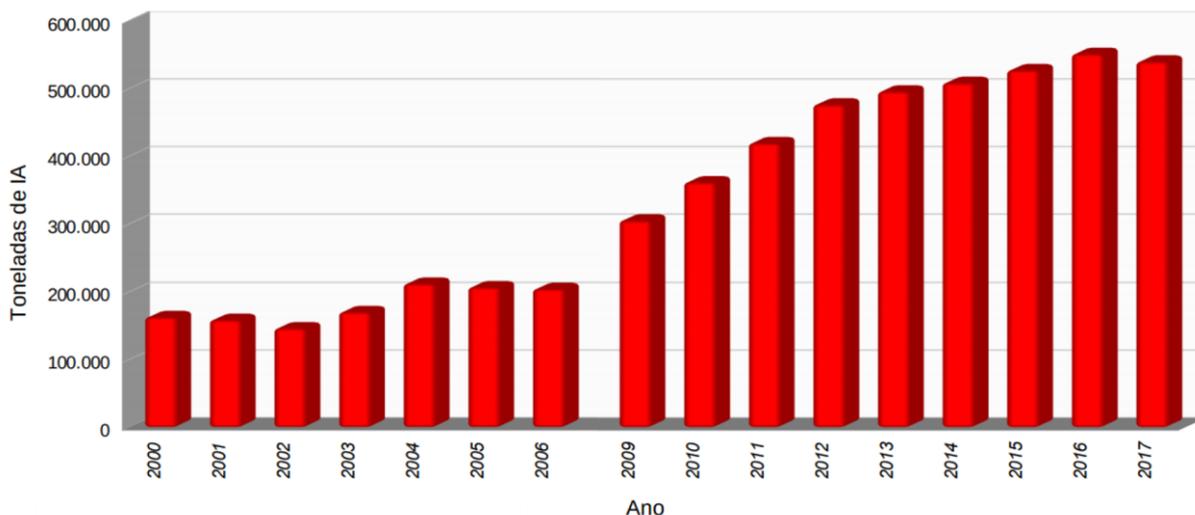
Estes danos se manifestam de várias formas, a curto prazo com irritação da pele e dos olhos, tontura, náusea e dores de cabeça. A longo prazo pode haver desenvolvimento de asma, diabetes, distúrbios endócrinos e neurológicos, doença de Parkinson, malformações congênitas, câncer, cancro, entre outras doenças (KIM; KABIR; JAHAN, 2017). O desenvolvimento de algum dano a saúde depende de fatores como, período de exposição e tipo de agrotóxico (SANTANA et al., 2016).

De acordo com o decreto 4.074/2002 do Ministério da Saúde, os agrotóxicos devem ser classificados segundo sua classe toxicológica (CHIARELLO et al., 2016). Estas classes são representadas por cores, e devem constar em forma de faixa no rótulo de cada agrotóxico (GOMES JUNIOR, 2017).

- Classe I (extremamente tóxico, altamente perigoso ao meio ambiente, faixa vermelha);
- Classe II (altamente tóxico, muito perigoso ao meio ambiente, faixa amarela);
- Classe III (moderadamente tóxico, perigoso ao meio ambiente, faixa azul);
- Classe IV (pouco tóxico, pouco perigoso ao meio ambiente, faixa verde).

Sobre a produção de agrotóxicos, de acordo com o relatório da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, estima-se que são produzidos por ano 2,6 milhões de toneladas de ingredientes ativos (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2017), e, segundo o Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional, a partir de 2008 o Brasil foi considerado o maior consumidor mundial de agrotóxicos (CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL, 2012). Dados de consumo no Brasil, entre 2000 e 2017, estão demonstrados na Figura 1.

**Figura 1 - Consumo de agrotóxicos no Brasil entre 2000 e 2017.**



**Nota: Dados atualizados em 25/06/2018. IA: ingrediente ativo. Fonte: Adaptado do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2019).**

Perante estudos do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA, realizado em todas as unidades federativas do Brasil, um terço dos alimentos que são consumidos diariamente pelos brasileiros encontra-se contaminado por diversas classes de agrotóxicos (INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2017). Sendo demonstrado que o carbendazim, o acefato e o clorpirifós foram os agrotóxicos que apresentaram maior índice de detecções irregulares, e que nas amostras analisadas por grupo químico, em primeiro lugar verificou-se a presença dos agrotóxicos organofosforados (PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS, 2016).

Os organofosforados são sintetizados para substituir os organoclorados, após tornar-se conhecido o longo tempo de resistência no meio ambiente e a alta toxicidade dos últimos. Estruturalmente, os organofosforados são derivados de éster ou tiol de ácido fosfórico, fosfônico ou fosfortiamídico, caracterizados pela presença de uma ligação P=O ou P=S. Substâncias organofosforadas são usadas como inseticidas em virtude da sua capacidade de inativar a enzima acetilcolinesterase, e desta forma prejudicam os impulsos nervosos (VAGI; PETSAS, 2019).

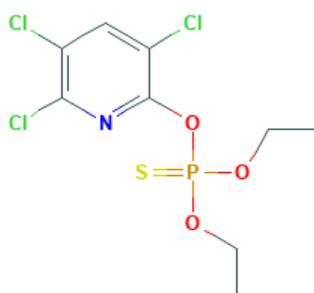
Tendo em vista a Diretiva 2013/39/UE, que inclui 45 substâncias químicas de alto risco, dentre elas estão 12 agrotóxicos organoclorados e 3 agrotóxicos organofosforados (VAGI; PETSAS, 2019), deste último grupo um deles é o clorpirifós, princípio ativo avaliado neste estudo.

### 3.1.1 Clorpirifós

O clorpirifós (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) (Figura 2) é um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo devido ao seu amplo espectro de atuação (FERRARIO et al., 2018). Sintetizado em 1965, é o princípio ativo de mais de 900 fórmulas comerciais, por exemplo, Dursban<sup>®</sup>, Lorsban<sup>®</sup>, Tricel<sup>®</sup>, Pyrinex<sup>®</sup>, Silrifos<sup>®</sup>, Spannit<sup>®</sup>, Talon<sup>®</sup>, Piridane<sup>®</sup>, Suscon Green<sup>®</sup>, Empire<sup>®</sup>, Whitmire PT 270<sup>®</sup>, Brdan<sup>®</sup>, Dowco 179<sup>®</sup>, Eradex<sup>®</sup>, Paqeant<sup>®</sup>, Scout<sup>®</sup>, Stipend<sup>®</sup>, Detmol UA<sup>®</sup>, entre outros (ISMAIL et al., 2013; JOHN; SHAIKE, 2015; MURILLO et al., 2010).

Inserido na classe dos inseticidas, acaricidas e formicidas, é utilizado no tratamento do solo, pré e pós plantio, na produção de algodão, arroz, tabaco, amêndoa, feijão, laranja, banana, maçã, e também no âmbito doméstico, para proteção de gramados, plantas ornamentais e em produtos de proteção animal (SAINI; KUMAR, 2016), no entanto, o maior consumo de clorpirifós em termos de quilos totais de ingrediente ativo é na produção de milho (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2019).

**Figura 2 - Fórmula estrutural do clorpirifós.**



**Fonte: PubChem (2018).**

Devido ao seu baixo custo e sua alta eficiência, o CP é um dos agrotóxicos mais utilizado em aplicações agrícolas e comerciais. Contudo, devido ao uso extensivo, ampla distribuição e longa persistência, combinada com seus efeitos nocivos aos ecossistemas, este composto constitui um dos poluentes mais frequentemente detectado, por exemplo, em águas superficiais, solos, sedimentos, e numa ampla gama de alimentos, incluindo frutas, legumes, grãos, peixes, inclusive em alimentos processados (SAINI; KUMAR, 2016; VAGI; PETSAS, 2019).

É possível encontrar na literatura propriedades relativas ao CP padrão, as quais podem auxiliar no entendimento da sua presença no meio ambiente, no entanto, o mais correto seria uma análise das propriedades da formulação comercial, porém, estas informações não se encontram disponíveis, de forma que algumas interpretações não sejam tão simples.

O clorpirifós possui massa molecular de  $350,59 \text{ g mol}^{-1}$ , solubilidade em água de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), constante de partição com carbono orgânico ( $K_{oc}$ ) de 9,93, pressão de vapor ( $P_{vap}$ ) de  $2,02 \times 10^{-5} \text{ mm Hg}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), constante de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) de 4,96, tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) em água (pH 7 e  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de 35 a 78 dias, e quando exposto à luz (natural e/ou artificial) sofre foto-transformação, com taxa de conversão de aproximadamente 50% em torno de 30 a 40 dias em água de rio (ISMAIL et al., 2013; LIMA, 2017; PUBCHEM, 2018).

De um modo geral, a solubilidade de um composto em água, indica a propensão deste em ser lixiviado. A pressão de vapor ( $P_{vap}$ ) indica a volatilidade e a presença na atmosfera. A constante de partição com carbono orgânico ( $K_{oc}$ ) refere-se a propensão da mobilidade de um composto no solo, e o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) refere-se a estabilidade em determinadas condições (GABARDO, 2018).

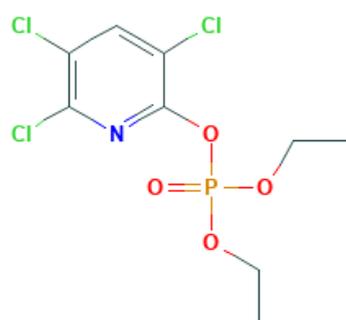
Já o valor de constante de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) indica a hidrofobicidade de um composto, bem como serve de indicativo da polaridade do mesmo, ou seja, quanto maior o valor de  $\log K_{ow}$  mais hidrófóbico é o composto, e quanto menor o valor mais hidrófilico. Quanto a polaridade, em geral, valores de  $\log K_{ow}$  entre 4 e 5 indicam compostos apolares, valores entre 1 e 1,5 indicam compostos polares, e aqueles que possuem valor entre 1,5 e 4 são considerados moderadamente polares (DIAS, 2018).

De acordo então com as propriedades do CP, este composto pode ser classificado como hidrófóbico, com baixa solubilidade em água, alto coeficiente de sorção no solo e volátil. Porém, sua aplicação se dá através do composto comercial, onde o CP encontra-se dissolvido em uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos contendo solvente de nafta, mistura de hidrocarbonetos aromáticos pesados e outros ingredientes não especificados no rótulo. Assim, estes compostos acabam contribuindo para que o clorpirifós apresente uma solubilidade muito maior, da ordem de  $500 \text{ g L}^{-1}$ , demonstrando claramente a dificuldade de uma análise direta de sua distribuição no ambiente, se consideradas apenas as propriedades do CP.

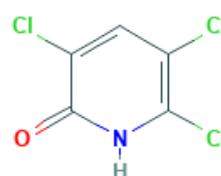
Em relação as propriedades toxicológicas, segundo o Dossiê Abrasco (2015), o clorpirifós é classificado como altamente tóxico ao meio ambiente (classe II), portanto, a exposição ao CP e seus metabólitos tem sido associada a uma variedade de distúrbios nervosos em humanos, tóxico para uma variedade de artrópodes benéficos, incluindo abelhas, joaninhas e vespas (AMALRAJ; PIUS, 2015), bem como para animais vertebrados, organismos estuarinos, invertebrados aquáticos e peixes de água doce (CÁRCERES et al, 2007; PINTO et al., 2015). Sendo encontrado resíduos de CP nos ecossistemas aquáticos em concentrações que variam de 0,01 a 1,95  $\mu\text{g L}^{-1}$  (FERRARIO et al., 2018). Porém, novamente deve-se destacar, que poucas informações estão disponíveis na literatura, para a toxicidade de formulações comerciais do CP, e menos ainda quando submetidas a tratamentos por AOPs.

Relatos de degradação do CP fornecem informações sobre rotas de formação de subprodutos como o clorpirifós-oxon (CPO) e o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) (Figura 3), reconhecidamente mais tóxicos que o próprio clorpirifós (JOHN; SHAIKE, 2015; TIWARI; GUHA, 2014). Neste trabalho a formação destes compostos e demais subprodutos de degradação serão investigados por HPLC-DAD, e serão avaliados quanto a sua ecotoxicidade.

**Figura 3 - Principais subprodutos de degradação do clorpirifós.**



clorpirifós-oxon (CPO)



3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP)

Fonte: PubChem (2018).

Cabe ressaltar ainda, que além da toxicidade ambiental, há uma preocupação quanto a presença do clorpirifós e seus subprodutos em água potável. A Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre o padrão de potabilidade da água e qualidade para consumo humano, estabelece valores máximos permitidos (VMP) de clorpirifós + clorpirifós-oxon de até 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em água para consumo (BRASIL, 2011).

Considerando baixos níveis de concentração, como é o caso do CP+CPO, as técnicas cromatográficas são fortemente indicadas para tais determinações, se destacando por suas capacidades de análise qualitativa e quantitativa.

Visto as diferenças de propriedades físicas e químicas dos compostos de interesse, volatilidade do CP e componentes da matriz (percebida pelo forte odor da amostra comercial), e relatos de análise destes compostos encontrados na literatura, as amostras que se pretende avaliar neste trabalho poderiam ser analisadas por cromatografia a gás ou cromatografia a líquido.

Alguns exemplos de trabalhos envolvendo análise cromatográfica do clorpirifós podem ser citados, Tiwari e Guha (2014) analisaram a biotransformação do CP por cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas (GC-MS); Ling et al. (2011), após lavagem e cozimento de vegetais, analisaram a presença de CP e seus metabólitos em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (GC-MSMS).

Femia et al. (2013) degradaram CP por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e realizaram a quantificação por cromatografia a líquido com detector UV (HPLC-UV); Slotkin et al. (2009) realizaram a fotólise do CP e quantificaram a degradação por cromatografia a líquido com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), mas analisaram os subprodutos por GC-MS; Utzig et al. (2019) e Lima (2017) também avaliaram a degradação do CP por HPLC-DAD, em ambos os trabalhos foram realizadas degradações por até 180 minutos.

### 3.1.2 Agrotóxicos e o meio ambiente

Mesmo havendo relatos de que os agrotóxicos possuem benefícios, seja na questão de produtividade agrícola, seja no controle de epidemias como a dengue e a malária, não se pode negar que estas substâncias estão entre as principais causadoras da poluição ambiental, visto que aproximadamente 2,6 milhões de toneladas são liberadas por ano no meio ambiente (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2017), atingindo diversos organismos, de diferentes níveis tróficos, alterando assim a dinâmica ambiental (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Depois de pulverizado/aplicado um agrotóxico, seu comportamento no meio ambiente é determinado por vários processos: físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Já o seu destino, é conduzido por processos de transformação (degradação química e/ou biológica), retenção (absorção ou sorção), transporte (carreamento superficial, deriva, volatilização e lixiviação), inclusive por interações destes processos (SPADOTTO, 2004).

O impacto causado pelo uso de agrotóxicos é facilmente percebido pela perda da qualidade dos recursos hídricos e, conseqüentemente, a supressão da biodiversidade devido à alta taxa de dispersão destes compostos, visto que uma parcela considerável atinge os corpos hídricos por carreamento atmosférico e ação erosiva da chuva, pela limpeza de recipientes e materiais empregados na pulverização, e também pela eliminação incorreta de resíduos da indústria de formulações (demonstração na Figura 4) (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014; LOPES DIAS et al., 2016).

**Figura 4 - Demonstração da dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente.**



Fonte: Adaptado de Nakamura (2015).

Os efeitos dos agrotóxicos no meio ambiente dependem diretamente das concentrações lançadas nos compartimentos ambientais (atmosfera, água, solo e planta), e, também, do modo de aplicação, dose ou quantidade usada, e do comportamento/destino destes compostos no meio ambiente (SPADOTTO, 2004).

Estudos indicam que do total de agrotóxico que é aplicado na agricultura, menos de 1% chega às lavouras, ou seja, mais de 99% destes produtos é disperso no solo, no ar e na água (GOMES JUNIOR, 2017), sendo que o escoamento superficial pode contaminar os mananciais próximos, como por exemplo os açudes de abastecimento público, e por meio da lixiviação pode contaminar os lençóis freáticos (BARBOSA, 2016).

Em estudos de monitoramento, há relatos da presença de diversas classes de agrotóxicos em diferentes fontes de água, como no estudo de Di Guardo e Finizio (2018) destacaram uma ampla presença de glifosato em águas superficiais na região da Lombardia, Itália.

Palma et al. (2014) averiguaram a presença de agrotóxicos em águas superficiais do reservatório de Alqueva (Portugal), em maior concentração foram encontrados bentazona, metolacoloro, MCPA, terbutilazina e 2,4-D. Bonifacio et al. (2017) registraram a presença de clorpirifós em riachos argentinos na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Em uma avaliação da bacia hidrográfica de Lajeado Tacongava, Rio Grande do Sul, Chiarello et al. (2016) verificaram a presença de nove resíduos de agrotóxicos com concentrações entre 0,1 e  $39,6 \mu\text{g L}^{-1}$ . Matias e Tamanaha (2016) encontraram, entre 2014 e 2015, o herbicida quinclorac e o inseticida carbofuran na bacia hidrográfica do rio Camboriú, Santa Catarina.

Le Coadou et al. (2017) encontraram agrotóxicos e seus metabólitos em amostras de água mineral francesa. McKnight et al. (2015) expuseram a presença de agrotóxicos em córregos e águas subterrâneas da bacia hidrográfica de Sjaelland, Dinamarca.

Azevedo, Moura e Santos (2016) avaliaram a presença de agrotóxicos no Rio Piquiri, Paraná, e encontraram sete resultados positivos nas amostras: ametrina, atrazina, azoxistrobina, carbendazim, clomazona, metolacoloro e simazina. Devido aos baixos valores de concentração encontrados, não se alega comprometimento da potabilidade da água, segundo valores máximos permitidos, no entanto, deve-se

considerar a toxicidade para os demais integrantes do ecossistema, fato este que na maioria das vezes é negligenciado.

Ccancapa et al. (2016) discorreram sobre a presença de clorpirifós, imazalil, diazinon, diuron e carbendazim, entre 2010 e 2011, na bacia do rio Ebro, Espanha. Yadav et al. (2015) relataram que há resíduos de agrotóxicos em corpos de água doce (rios, lagos e estuários) por toda a Índia, inclusive na água potável.

Machado et al. (2016) realizaram um levantamento de contaminantes emergentes em águas brasileiras. Cem amostras de água potável foram investigadas em 22 capitais brasileiras, no período de 2011-2012. O estudo avaliou diferentes classes de contaminantes emergentes, incluindo plastificantes, hormônios, cafeína, triclosan e o herbicida atrazina. Em água potável foi verificado a presença de atrazina nas concentrações 2,0 a 6,0 ng L<sup>-1</sup>, e em água de nascente as concentrações foram de até 15 ng L<sup>-1</sup>. Este resultado demonstra que a presença de agrotóxico em água tratada é uma realidade no Brasil, e indica deficiência nas estações de tratamento.

Em estudo recente, realizado no estado de Santa Catarina, a pedido do Ministério Público de Santa Catarina, foram avaliadas 100 amostras de água potável, coletadas em 90 cidades, no período entre março e outubro de 2018. Foram encontrados traços de agrotóxicos em 22 municípios, inclusive substâncias banidas na União Europeia por causa dos danos à saúde humana. Estes resultados comprovam a baixa eficiência dos sistemas de tratamento de água para remoção de agrotóxicos (G1, 2019).

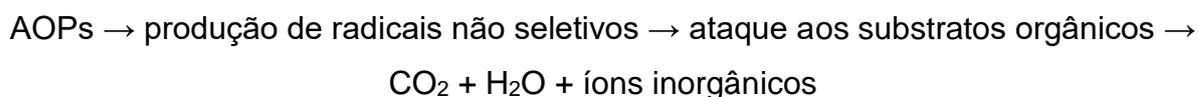
Os relatos de agrotóxicos sendo encontrados em água potável, e em efluentes de estações de tratamento de esgoto, comprovam que os processos convencionais de tratamento não são totalmente eficazes, devido à natureza recalcitrante dos diversos contaminantes lançados, portanto, existe a carência de processos alternativos de remediação, que busquem melhorar o tratamento destes poluentes, sendo uma alternativa promissora os processos avançados de oxidação (ALALM; TAWFIK; OOKAWARA, 2015; DUTTA et al., 2015).

### 3.2 PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

Os processos avançados de oxidação, do inglês *Advanced Oxidation Processes* (AOPs), estão baseados na formação *in situ* de radicais hidroxila (HO<sup>•</sup>), os

quais apresentam alto poder oxidante ( $E^{\text{Ox}} = 2,80 \text{ V}$ ), não seletividade, capazes de mineralizar muitos compostos orgânicos em  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , íons inorgânicos ou em substâncias menos recalcitrantes (AUTIN et al., 2013; BERBERIDOU et al., 2017; LIMA et al., 2017; LÓPEZ et al., 2017; LUO et al., 2014; PARKER et al., 2017; SUNIL PAUL et al., 2013).

Os processos avançados de oxidação podem ser classificados por vários critérios, tais como: (i) a metodologia aplicada para gerar os radicais oxidantes (ii) utilização de irradiação ou não, (iii) sistema homogêneo ou heterogêneo, ou se é feito o uso de catalisadores heterogêneos. Independentemente do processo utilizado, o que é comum a todos é a produção de espécies altamente reativas, como os radicais hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), que depois atacam os substratos orgânicos contidos nas matrizes poluídas, geralmente, convertendo-os em produtos com menor complexidade e toxicidade em comparação aos compostos iniciais, ou, idealmente, chegando em sua mineralização total, conforme esquema demonstrado abaixo (VAGI; PETSAS, 2019).



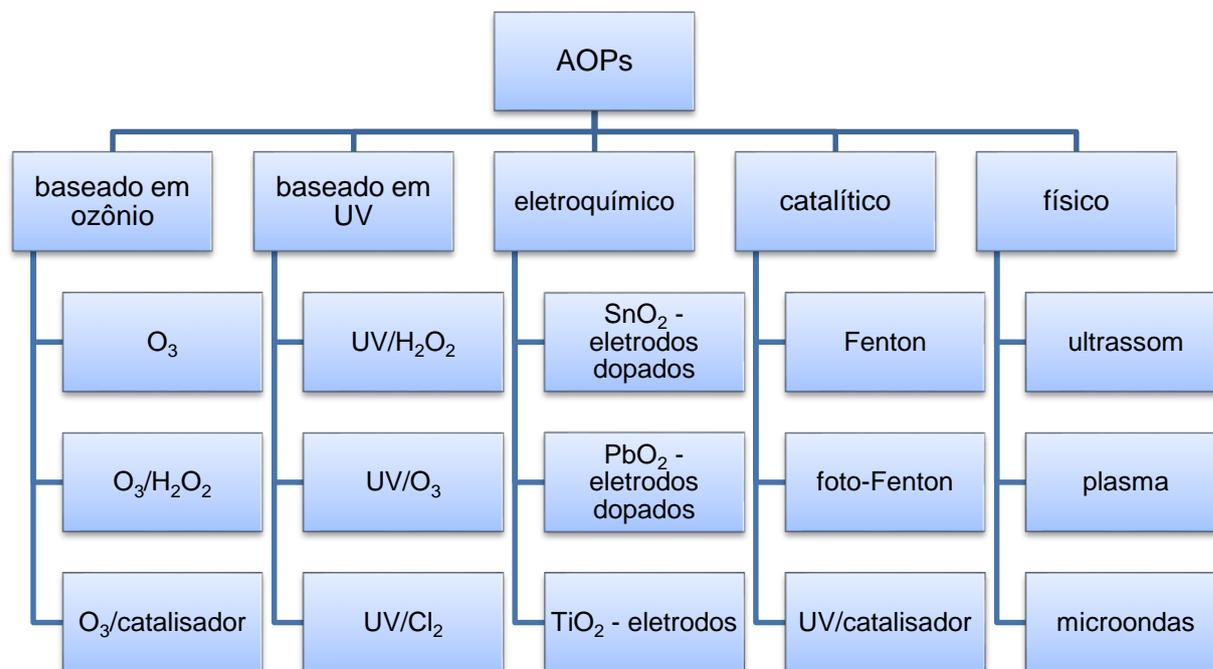
O radical livre  $\text{HO}_2^\bullet$  e seu conjugado  $\text{O}_2^{\bullet-}$  também estão envolvidos nos processos de degradação, porém, esses radicais não são tão reativos quanto os radicais hidroxila. A espécie de radical hidroxila reage fortemente com a maioria das substâncias orgânicas por abstração de hidrogênio, ou adição eletrofílica à duplas ligações. Os radicais livres reagem ainda com o oxigênio molecular para dar origem a um radical peroxila, iniciando uma sequência de reações de degradação oxidativa, que podem conduzir à mineralização completa do contaminante. Além disso, os radicais hidroxila podem atacar os anéis aromáticos nas posições ocupadas por um halogênio, gerando um homólogo de fenol (CHIRON et al., 2000).

O tempo de meia vida dos radicais hidroxila em água é estimado em menos de 70 ns, ou seja, reações entre  $\text{HO}^\bullet$  e compostos orgânicos são extremamente rápidas, na ordem de  $10^6 - 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Desta forma, são as principais espécies envolvidas no tratamento de diversos contaminantes orgânicos (CHENNA et al., 2015). A produção destes radicais é possibilitada por diferentes processos avançados de oxidação, alguns exemplos estão citados na Figura 5.

Neste estudo avaliou-se a eficiência de degradação do agrotóxico comercial Lorsban®, por um processo avançado de oxidação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é um processo fotoquímico, e por fotólise UVC.

Nos processos fotoquímicos é necessário uma fonte de luz artificial [(a radiação utilizada pode ser UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) ou UVC (200-280 nm)], em situações de laboratório, obtidas por diferentes tipos de lâmpadas, normalmente de mercúrio ou xenônio) ou então luz solar natural. As reações que normalmente se observam após um contaminante ser irradiado com luz UV são: decloração, formação de espécies radicais e substituição de átomos de cloro por grupos hidroxila (CHIRON et al., 2000; UTZIG, 2016).

**Figura 5 - Exemplos de processos avançados de oxidação.**

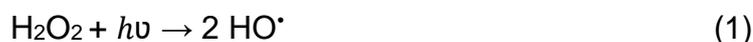


Fonte: Adaptado de Miklos et al. (2018).

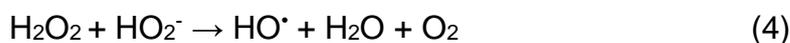
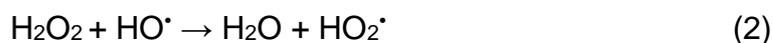
A eficiência de degradação de AOPs fotoquímicos pode ser otimizada por fotocatalise homogênea ou heterogênea. Nos processos heterogêneos utilizam-se semicondutores (por exemplo, UV/TiO<sub>2</sub>), enquanto nos processos homogêneos utilizam-se sistemas de fase única (por exemplo, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (CHIRON et al., 2000).

### 3.2.1 Processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser descrito como a fotólise do peróxido de hidrogênio por radiação ultravioleta, em comprimento de onda de 254 nm. Nesta reação ocorre a cisão homolítica da molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou seja, a quebra de uma ligação sigma (O-O do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de elevada energia, gerando portanto, radicais hidroxila (HO•) (Equação 1), que atuam na degradação de espécies orgânicas poluentes (CHENNA et al., 2015; LOPEZ-ALVAREZ et al., 2016; OLAK-KUCHARCZYK; LEDAKOWICZ, 2017; STARLING et al., 2019).



Outras espécies formadas durante o processo estão demonstradas abaixo (Equações 2-4) (BENSALAH; CHAIR; BEDOUI, 2017).



Visto os potenciais de oxidação, os radicais hidroxila ( $E^0_{\text{ox}} = 2,80 \text{ V}$ ) são mais eficientes que o peróxido de hidrogênio molecular ( $E^0_{\text{ox}} = 1,78 \text{ V}$ ), promovendo assim uma oxidação mais energética. Ao utilizar radicais hidroxila, contaminantes orgânicos podem ser oxidados por três mecanismos: transferência eletrônica (geralmente ocorre com hidrocarbonetos clorados), adição eletrofílica (geralmente ocorre com hidrocarbonetos insaturados ou aromáticos) e abstração de hidrogênio (geralmente ocorre com hidrocarbonetos alifáticos). A ocorrência de um ou outro mecanismo de reação depende da presença, concentração e recalcitrância dos compostos orgânicos (BRITO; SILVA, 2012).

O sistema é facilmente implementado, no entanto, necessita de alta energia para a decomposição do peróxido de hidrogênio, visto que por ser incolor não absorve luz visível, e para que ocorra a cisão homolítica utiliza-se somente radiação de onda curta, na faixa UVC (BOCZKAJ; FERNANDES, 2017; BRITO; SILVA, 2012).

### 3.3 FOTÓLISE

A fotólise é considerada um dos mecanismos mais importantes de degradação de poluentes ambientais. Este mecanismo pode ocorrer de duas maneiras, através de fotólise direta ou indireta. A fotólise direta ocorre por meio da absorção de luz pelo próprio contaminante, onde o cromóforo da molécula absorve a energia radiante para formar uma molécula ativada, e desta forma ser degradada por homólise, heterólise ou fotoionização (LIN; LIN; LEE, 2014; REDDY; KIM, 2015; ZHU et al., 2014).

Já na fotólise indireta, ocorre a absorção de luz pela matéria orgânica dissolvida, por exemplo, em ambiente aquoso podem haver nitritos e nitratos, ácido húmico e ácido fúvico, minerais ou metais de transição em solos, que produzam espécies reativas e que facilitam a degradação dos contaminantes por processo de fotoxidação, como na fotólise direta. No caso dos agrotóxicos comerciais, os próprios compostos contidos na fórmula do produto podem atuar na destruição do ingrediente ativo (LIN; LIN; LEE, 2014; REDDY; KIM, 2015; ZHU et al., 2014).

### 3.4 DEGRADAÇÃO DE AGROTÓXICOS POR AOPs

Diversos estudos de degradação de poluentes orgânicos são relatados na literatura através de diferentes processos avançados de oxidação, por exemplo, tratamento de produtos farmacêuticos, agroquímicos, derivados de refinaria de petróleo e lixiviados de aterro sanitário (RAHIM POURAN; ABDUL AZIZ; WAN DAUD, 2015), águas residuais (DÍAZ-GARDUÑO et al., 2016), contaminantes emergentes (DE LA CRUZ et al., 2013; HEBERLE et al., 2019), fenol (BABUPONNUSAMI; MUTHUKUMAR, 2014), corantes (NAVARRO; GABALDÓN; GÓMEZ-LÓPEZ, 2017), cianotoxinas (JASIM; SATHTHASIVAM, 2016), entre outros (GIANNAKIS, 2019; TORRES et al., 2018), inclusive agrotóxicos.

Dentre os trabalhos de degradação de agrotóxicos por diferentes AOPs, Lopez-Alvarez et al. (2016) avaliaram a degradação do carbofuran (Furadan<sup>®</sup>) e da iprodiona (Rovral<sup>®</sup>), inseticida e fungicida, respectivamente, por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e obtiveram 75% de mineralização da mistura.

Abdessalem et al. (2010) estudaram a degradação de uma mistura de três agrotóxicos por processos foto-Fenton e eletro-Fenton, e demonstraram uma remoção de carbono orgânico total (TOC) de 82% em 60 minutos de tratamento foto-Fenton e 240 minutos de tratamento eletro-Fenton. No final dos processos (480 minutos) obteve-se uma remoção de TOC de 93% e 94%, respectivamente, indicando uma mineralização inicial mais rápida com o processo foto-Fenton.

Gozzi et al. (2012) estudaram a eficiência de degradação do herbicida clorimuron-etil frente a três processos, Fenton, foto-Fenton e ozonização, e relataram a obtenção de melhores resultados com o processo foto-Fenton, onde atingiram taxas de degradação maior que 97%, e de mineralização maior que 88%, provando ser uma técnica promissora.

Martinez, Delgado e Jarvis (2016) avaliaram a eficácia de degradação do herbicida mecoprop (padrão analítico), em água deionizada e água superficial de uma região escocesa com diferentes AOPs (UV/PS, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/TiO<sub>2</sub>, Fenton e foto-Fenton), e demonstraram que o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seria a melhor opção, visto a rápida degradação do mecoprop e a possibilidade de aplicação em grande escala.

Jefferson et al. (2016) estudaram a degradação do agrotóxico metaldeído (padrão analítico) por dois AOPs (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/TiO<sub>2</sub>), em água sintética e água natural (retirada de uma estação de tratamento de água do Reino Unido), e concluíram que o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um tratamento robusto e uma alternativa viável para degradar compostos recalcitrantes.

Dentre os trabalhos de degradação do clorpirifós por diferentes AOPs, Thind, Kumari e John (2018) desenvolveram experimentos em reator de bancada (com capacidade de 250 mL), a partir da metodologia de superfície de resposta, para degradar 200 mL de clorpirifós (100 mg L<sup>-1</sup>) por TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVA, com lâmpada de mercúrio de 60 W. Sob condições otimizadas, após 3 horas de tratamento, atingiram 68,29% e 74,38% de degradação de DQO e de CP, respectivamente.

Murillo et al. (2010) estudaram a eficiência de degradação do CP (30 mg L<sup>-1</sup>) por processos foto-Fenton (radiação solar e artificial), TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>3</sub>, em diferentes volumes. Nos processos foto-Fenton, em 5 minutos de tratamento atingiu-se 82% de degradação com radiação solar, e 91% com radiação artificial. Nos processos TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 20 minutos não foi mais possível detectar o CP, e após 30 minutos também não foi mais possível detectar o CP com O<sub>3</sub>.

Amiri et al. (2018) avaliaram a degradação de 2,5 L de um efluente da agricultura, enriquecido com clorpirifós ( $2,74 \text{ mg L}^{-1}$ ), tratado por  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  (radiação solar) em fotorreator de lagoa (com capacidade de 7,5 L). Após otimização dos parâmetros, utilizando metodologia de superfície de resposta, em 62,5 minutos de tratamento obtiveram 84,01% de degradação do CP.

Utzig (2016) realizou a degradação do CP padrão analítico ( $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) por processo  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$  e fotólise UVC, durante 180 minutos, em reator de bancada com capacidade de 250 mL e lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio (125 W), alocada a 10 cm da borda do reator. Após 10 minutos de processo  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$  atingiu-se uma degradação de 84,98%, e, após 60 minutos de tratamento por fotólise UVC atingiu-se uma degradação de 92,41% do CP.

Femia et al. (2013) avaliaram a eficiência da degradação do clorpirifós comercial ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) por processo  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ , as degradações foram realizadas em reator anular de quartzo com capacidade de 1,2 L. Após 20 minutos de tratamento foi obtido 93% de degradação do CP com  $450 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Juntamente ao tratamento, avaliaram a ecotoxicidade das amostras com *V. fischeri*, constatando após 20 minutos de tratamento redução da toxicidade de 100% para 60%, no entanto, aumentou para 95% após 40 minutos, inferindo a presença de subprodutos de maior toxicidade, que foram gerados ao longo da reação, e, após 300 minutos a toxicidade diminuiu para 10%. Percebe-se que o acompanhamento da toxicidade das amostras é essencial nos estudos de degradação.

### 3.5 BIOENSAIOS

Atualmente muitas pesquisas têm utilizado bioensaios para determinar o impacto de contaminantes ambientais em diferentes organismos-teste (AGUIAR; ANDRADE-VIEIRA; OLIVEIRA DAVID, 2016; FERRARIO et al., 2018; HENTATI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; SOLÍS et al., 2016). Os bioensaios medem a resposta de determinados organismos à exposição de contaminantes em comparação a um controle, podendo ser utilizado microrganismos, algas, plantas, invertebrados ou peixes (HEBERLE et al., 2019; WANG et al., 2018).

Os estudos de ecotoxicidade ajudam na compreensão dos mecanismos de ação dos mais diversos poluentes ambientais, e são extremamente importantes em toxicologia ambiental, inclusive para determinarem a eficiência de um processo de tratamento, visto que dificilmente a mineralização completa é alcançada, e, principalmente, quando as análises quantitativas disponíveis não atingem níveis traços (LIMA, 2017).

Trabalhos de avaliação da ecotoxicidade dos agrotóxicos relatam que baixas concentrações destes compostos podem provocar alterações nos organismos-teste, imobilidade e a morte (DEMETRIO; BONETTO; RONCO, 2014; FATMA et al. 2018; MARIGOUDAR et al., 2018; REBECHI et al., 2014).

Os testes de toxicidade aguda são realizados para verificar a concentração de uma substância, que causaria uma determinada resposta mensurável em um organismo-teste, num período de tempo relativamente curto, normalmente 24 ou 48 horas. As respostas destes testes, geralmente, são relacionadas com a taxa de mortalidade ou imobilização dos organismos (BERTON, 2013)

Os valores de toxicidade aguda estão baseados na concentração do agrotóxico que causa mortalidade em 50% dos organismos expostos, dito concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) ou concentração letal (CL<sub>50</sub>) (AMÉRICO et al., 2015).

Já os testes de toxicidade crônica, são realizados para verificar os efeitos de uma substância em um período de tempo, que pode ser parte ou então todo o ciclo de vida de um organismo-teste. Desta forma, é possível acompanhar os efeitos de uma exposição prolongada à concentrações sub-letais, ou seja, determinadas concentrações de uma substância tóxica onde os organismos sobrevivem, porém, afetam algumas das suas funções biológicas (por exemplo, crescimento e maturação, reprodução, desenvolvimento de ovos, entre outras) (BERTON, 2013).

A utilização de organismos de diferentes níveis tróficos é muito importante para a compreensão dos efeitos tóxicos dos compostos em análise (HEBERLE et al., 2019), e também auxilia na comparação entre trabalhos de áreas distintas (DÍAZ-GARDUÑO et al., 2016). Neste estudo utilizou-se organismos de três níveis tróficos para a realização dos bioensaios, dois deles bem relatados na literatura (*Daphnia magna* e *Lactuca sativa*), e um deles pouco conhecido para esta finalidade (larvas de *Aedes aegypti*).

### 3.5.1 *Daphnia magna*

*Daphnia sp* (microcrustáceo da Ordem Cladocera) é um organismo muito utilizado em estudos ecotoxicológicos em todo o mundo, devido à sua alta sensibilidade, ciclo de reprodução curto e por gerar testes bem estabelecidos e padronizados. Organismos do gênero *Daphnia* pertencem ao plâncton de águas continentais, e são amplamente representados na Argentina com uma dúzia de espécies. Estes invertebrados vivem naturalmente em rios e lagos de água doce, e servem como organismos sentinela do ambiente (CÁRCERES et al, 2007; DEMETRIO; BONETTO; RONCO, 2014).

A espécie *Daphnia magna* (Figura 6) se reproduz pela partenogênese cíclica, desde que em condições favoráveis de temperatura e alimentação, são capazes de se reproduzir sexuadamente e assexualmente. No último caso, fêmeas geneticamente idênticas às suas mães são produzidas, sendo ideais para bioensaios visto a baixa variabilidade genética (PALMA et al., 2009).

**Figura 6 - *Daphnia magna*, amplamente utilizada em bioensaios.**



**Nota: Observação em microscopia óptica, aumento de 40x (tamanho real médio de 5 a 6 mm).  
Fonte: Autoria própria.**

Em um estudo realizado com *Daphnia magna*, Demetrio, Bonetto e Ronco (2014) avaliaram a toxicidade dos ingredientes ativos e das fórmulas comerciais de três agrotóxicos (cipermetrina, clorpirifós e glifosato). A partir dos resultados dos bioensaios, relataram que as três fórmulas comerciais eram mais tóxicas do que o próprio ingrediente ativo (i.a.) em questão. Estes dados ecotoxicológicos devem ser

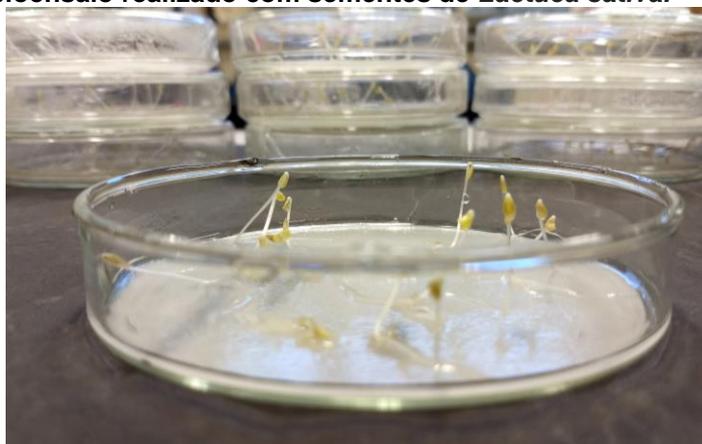
enfaturados, visto que muitos limiares regulatórios são estimados a partir da  $CL_{50}$  do ingrediente ativo para haver a liberação das formulações, e erroneamente o efeito tóxico destes compostos podem estar sendo subestimados.

### 3.5.2 *Lactuca sativa*

Ensaio que utilizam plantas como organismo-teste se destacam por sua simplicidade, baixo custo e por seus diferentes parâmetros de avaliação (taxa de germinação, atividade enzimática ou peso de biomassa), por ser um método reprodutível, as sementes são auto-suficientes (não sendo necessários adjuvantes/nutrientes), o tamanho/volume de amostra é pequeno, sem sazonalidade, as sementes podem ser facilmente adquiridas a granel e permanecem viáveis por um longo tempo, além de possuírem germinação rápida (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017; RIZZO, 2011; SILVEIRA et al., 2017).

Entre as plantas utilizadas para este fim, *Allium cepa* (cebola) é o organismo mais utilizado em testes de citotoxicidade e genotoxicidade, enquanto *Lactuca sativa* (alface) (Figura 7) já é amplamente utilizada em avaliações fitotóxicas e vem ganhando destaque em análises citotóxicas. Historicamente, esta última espécie serviu de organismo-teste em estudos de efeitos alelopáticos devido à sua rápida germinação, sensibilidade e uniformidade (SILVEIRA et al., 2017).

**Figura 7 - Exemplo de bioensaio realizado com sementes de *Lactuca sativa*.**



Fonte: Autoria própria.

No estudo de Silveira et al. (2017), houve comparação entre *A. cepa* e *L. sativa* via análise macroscópica (crescimento radicular) e microscópica (ciclo celular, ensaios cometa e fragmentação de DNA), após a exposição de suas raízes à poluentes ambientais, inclusive o herbicida atrazina. Ambas as espécies apresentaram resposta sensível e efetiva para avaliar riscos de poluentes ambientais, permitindo concluir que ambas, alface e cebola, são excelentes organismos-teste, pois proporcionam análises simples de diferentes parâmetros com resultados rápidos e eficientes.

Outras espécies que podem ser utilizadas em bioensaios são: pepino (*Cucumis sativus*), rabanete (*Raphanus spp* L.), trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) e trigo (*Triticum aestivum*). Entretanto, estudos anteriores recomendam *L. sativa* como um bioindicador para determinar a toxicidade de amostras de solo e água (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017).

Dados da literatura indicaram que o clorpirifós e seus metabólitos possuem efeitos fitotóxicos em várias plantas terrestres e aquáticas, por exemplo, na germinação de sementes e plântulas de *Pinus halepensis*, mostarda branca (*Sinapis alba* L.), soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays* L.) e azevém anual (*Lolium multiflorum*). Observou-se também, que os danos fitotóxicos na germinação de sementes, sobrevivência e crescimento das plantas se intensifica com o aumento da concentração de clorpirifós (JOHN; SHAIKE, 2015).

Poucos estudos avaliaram alterações fitotóxicas em plantas cultivadas após aplicação de processos avançados de oxidação, em amostras aquosas contendo agrotóxicos. Até aonde se pode determinar, o único artigo sobre fitotoxicidade do clorpirifós (padrão analítico), utilizando sementes de *L. sativa*, após tratamento por AOP foi descrito por Utzig et al. (2019).

### 3.5.3 *Aedes aegypti*

Este organismo, tem sido utilizado recentemente como indicador do efeito tóxico de compostos organofosforados, pertencente à classe Diptera: Culicidae, é um mosquito originário da África, cujo nome específico (*Aedes aegypti*) lhe foi conferido por ser descrito primeiramente no Egito. Desde então tem acompanhado o homem em sua permanente migração, e atualmente tem sua distribuição mundial. Este

mosquito é amplamente reconhecido por ser transmissor da febre amarela, dengue, zika e chikungunya (BRAGA; VALLE, 2007; TEDJOU et al., 2019).

Segundo o protocolo da Organização Mundial da Saúde, larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Figura 8) podem ser utilizadas em testes que avaliam sua resistência ou suscetibilidade à inseticidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981), no entanto, seu uso em testes de ecotoxicidade ainda é incomum.

Novamente, o único artigo encontrado até o momento é o estudo de Utzig et al. (2019), demonstrando a aplicabilidade dos testes com as larvas após avaliar o tratamento do CP (padrão analítico), até mesmo em concentrações do composto abaixo do limiar de quantificação.

**Figura 8 - Larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas em bioensaio.**



**Fonte: Autoria própria.**

A utilização de pelo menos três espécies de organismos-teste, com funções ecológicas relevantes, demonstra-se necessária, visto que apenas uma espécie não é capaz de fornecer os possíveis efeitos da substância analisada (HEBERLE et al., 2019; LIZANO-FALLAS et al., 2017).

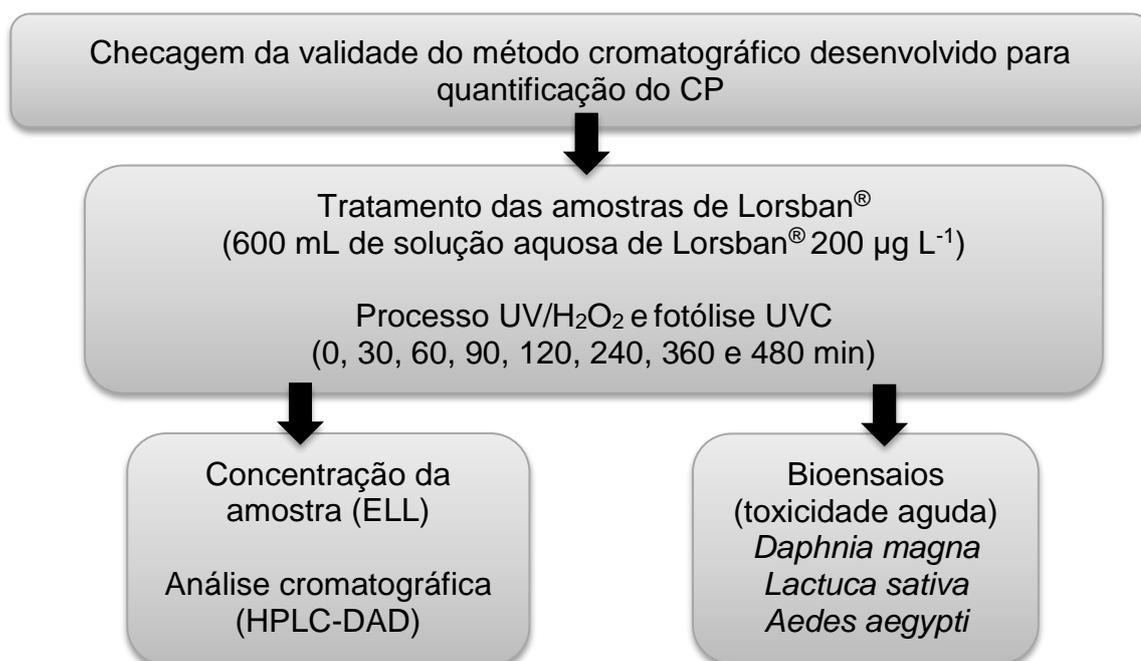
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO

As degradações deste estudo, processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, ocorreram por diferentes tempos de tratamento (30, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos). Após cada tratamento, buscou-se avaliar a concentração residual do CP, e a presença de subprodutos, por HPLC-DAD, bem como a ecotoxicidade da solução com três organismos teste: *Daphnia magna*, sementes de *Lactuca sativa* e larvas de *Aedes aegypti*.

Para a análise da concentração residual do clorpirifós (CP) optou-se pela extração líquido-líquido (ELL), a qual foi desenvolvida e validada no grupo de pesquisa (LIMA, 2017). A quantificação residual do CP foi analisada por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD), também desenvolvida e validada no grupo de pesquisa (UTZIG, 2016). A ordem das atividades realizadas no decorrer do trabalho estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma representativo das etapas realizadas neste trabalho.



## 4.2 REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

No preparo das soluções estoque foram utilizados os seguintes padrões analíticos: clorpirifós 99,9% de pureza (Sigma-Aldrich), clorpirifós-oxon 98,8% (ChemService) e 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) 99,2% (Sigma-Aldrich), todos grau Pestanal<sup>®</sup>. O produto comercial utilizado foi o Lorsban<sup>®</sup> 48% (Dow AgroSciences), que tem como princípio ativo o clorpirifós.

Outros reagentes utilizados foram: peróxido de hidrogênio 35% m/m (Peróxidos do Brasil), Allper<sup>®</sup> (Peróxidos do Brasil), acetonitrila grau cromatográfico (J.T. Baker), água purificada em sistema denominado de osmose (Quimis), água ultrapura (MegaPurity), catalase de fígado bovino 4% m/v (Sigma-Aldrich), NaOH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de grau analítico, Peroxid-test<sup>®</sup> (Merck) e membrana de PTFE de 0,45 µm de porosidade (Sartorius Stedim Biotech GmbH).

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica (AUY 220, Shimadzu), radiômetro (MRUR-203, Instruterm), lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio de 125 W (Osram), agitador magnético (752A, Fisatom), rotaevaporador (RV10, IKA<sup>®</sup>), bomba de vácuo (TE-0581, Tecnal), ultrassom (Eco-Sonics), pHmetro (HI2211, Hanna Instruments), câmara de germinação (Solab), espectrofotômetro (Cary 50 Bio, Varian) e HPLC-DAD (1260 Infinity, Agilent).

### 4.2.1 Soluções estoque de CP, CPO e TCP para análise cromatográfica

As soluções estoque de clorpirifós (CP), clorpirifós-oxon (CPO) e 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), foram preparadas em acetonitrila (1000 mg L<sup>-1</sup>), sendo armazenadas no freezer em frascos âmbar. Para análise cromatográfica, as soluções de trabalho (200 µg L<sup>-1</sup>) foram preparadas a partir da diluição da solução estoque, em água de osmose com 0,2% de acetonitrila, devido ao método anteriormente validado no grupo de pesquisa (UTZIG, 2016).

#### 4.2.2 Solução estoque de Lorsban® para os ensaios de degradação

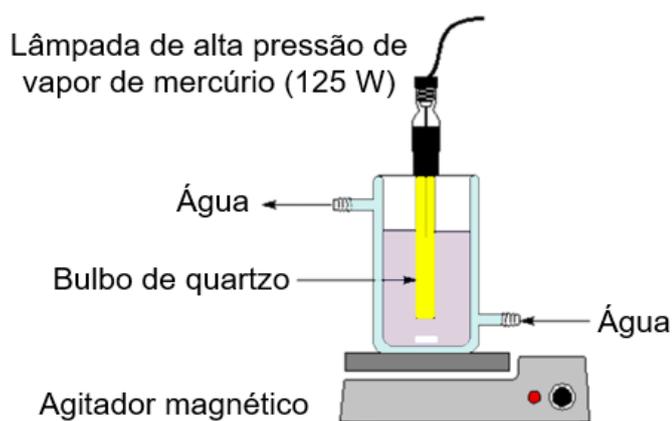
O agrotóxico comercial Lorsban® é um concentrado emulsionável cuja concentração de clorpirifós (CP) é 48% (m/v), o restante é descrito como uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos 53,6% (m/v) e demais ingredientes. As soluções foram preparadas levando em consideração apenas a concentração nominal do princípio ativo, o CP.

A partir do produto comercial Lorsban®, preparou-se uma solução estoque em água ultrapura ( $240 \text{ mg L}^{-1}$ ), sendo armazenada no freezer em frasco âmbar. As soluções de trabalho ( $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram preparadas no dia da degradação, em água de osmose, a partir da diluição da solução estoque.

#### 4.3 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO

As degradações foram realizadas em reator de bancada (Figura 10), com capacidade de 600 mL de solução, equipado com refrigeração (água de torneira), agitação magnética e lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio de 125 W (Osram), sem o bulbo protetor original, inserida na solução por meio de um bulbo de quartzo, com emissão máxima de radiação em 254 nm.

Figura 10 - Esquema do reator fotoquímico de bancada equipado com radiação artificial.



Fonte: Adaptado de Liz (2013).

Em trabalho anteriormente desenvolvido no grupo de pesquisa (UTZIG, 2016), a incidência de radiação UVC emitida era de  $0,75 \text{ mW cm}^{-2}$ , para uma distância de 10 cm do reator, e concentração utilizada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $12 \text{ mg L}^{-1}$ . Neste trabalho, utilizando a lâmpada mergulhada na solução, cuja intensidade de radiação UVC emitida foi de  $10,97 \text{ mW cm}^{-2}$ , definiu-se um valor de concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir de uma proporção aproximada de radiação UVC, em relação ao estudo de Utzig (2016), sendo então utilizado  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Inicialmente era adicionado  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e então readicionado esta mesma quantidade a cada 15 minutos de tratamento.

A concentração de clorpirifós utilizada nos tratamentos foi de  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  conforme trabalho de Utzig (2016), corroborando com o estudo de Rizzo et al. (2019), onde há relatos de demais trabalhos que também utilizaram concentrações próximas a esta em análises ambientais.

Todos os tratamentos foram realizados com o pH natural da solução (entre 5 e 6). As degradações foram avaliadas em sete tempos: 30, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos, a cada tempo uma nova batelada do reator era iniciada, e ao final de cada ensaio de degradação o pH da solução contida no reator era ajustado para 7.

No caso do processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , ao término de cada reação era adicionado solução de catalase (1%), até completa remoção do peróxido de hidrogênio residual (FEMIA et al., 2013), confirmada com Peroxid-test®.

Ao término de cada tempo de tratamento, de ambos os processos, UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  e fotólise UVC, eram retiradas alíquotas para a extração líquido-líquido e para os bioensaios. A eficiência dos tratamentos foi avaliada segundo a Equação 5, ou seja, através da relação entre a concentração inicial de CP ( $C_0$ ) e a concentração final (C).

$$\text{Eficiência} = 100 \times \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) \quad (5)$$

#### 4.3.1 Determinação do peróxido de hidrogênio residual

Através de metodologia espectrofotométrica, avaliou-se a quantidade de peróxido de hidrogênio residual utilizando reagente Allper® (BRANDHUBER;

KORSHIN, 2009), sendo retirado 3 mL de amostra do reator, a cada 15 minutos de processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e misturado a 3 gotas do reagente. Nos tempos mais longos de degradação as amostras eram retiradas a cada 30 minutos, para que o volume do reator não baixasse consideravelmente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Cary 50 Bio, Varian), com cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico), na faixa de absorção de 395 nm. As quantificações foram realizadas a partir de uma curva analítica de 0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup>, demonstrada no Anexo A.

#### 4.3.2 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (ELL) foi baseada na metodologia de Nayak et al. (2016), com adaptações de acordo com o fator de concentração desejado. O método foi desenvolvido e validado anteriormente no grupo de pesquisa (LIMA, 2017), os ensaios de recuperação estão expostos no Anexo B.

As extrações foram realizadas em duplicata para cada reator. Em dois funis de separação de 250 mL, adicionou-se 100 mL de amostra e 4 vezes de 10 mL de acetato de etila. A cada adição, agitou-se a mistura e separou-se as fases, orgânica e aquosa. Ao fim deste processo obteve-se um fator de concentração (FC) de 2,5 vezes.

A partir desta etapa inicial, de acordo com o fator de concentração desejado para a amostra final, em função da detecção cromatográfica, foram feitas novas etapas de concentração das amostras.

Para a amostra de 30 minutos do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evaporou-se 4 mL da fase orgânica em fluxo de nitrogênio, e reconstituiu-se em 0,2 mL de água de osmose com 0,2% de acetonitrila, obtendo-se um fator de concentração (FC) de 50 vezes.

Para a amostra de 30 minutos da fotólise UVC, evaporou-se 1,6 mL da fase orgânica em fluxo de nitrogênio, e reconstituiu-se em 0,2 mL de água de osmose com 0,2% de acetonitrila, obtendo-se um fator de concentração de 20 vezes. Decidiu-se por um FC menor visto que em trabalhos anteriores a fotólise realizava degradação mais lenta quando comparada com o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para as demais amostras, de ambos os tratamentos, dos tempos de 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos, foi necessário misturar as amostras obtidas inicialmente em duplicata para obter um fator de concentração maior, a fim de buscar determinar

a presença do CP no meio reacional, visto o limite de detecção cromatográfico. Para isso, rotaevaporou-se 50 mL da fase orgânica em rotaevaporador, e reconstituiu-se em 0,5 mL de água de osmose com 0,2% de acetonitrila, obtendo-se um fator de concentração de 250 vezes.

Portanto, considerando-se a curva analítica, a qual apresenta limite de quantificação de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ , a partir dos fatores de concentração de 20, 50 e 250, assumiu-se que os limites de quantificação do CP passaram a ser 0,75, 0,30 e 0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Para o tempo de 0 minutos, não foi realizada a concentração da amostra, sendo adicionado ao funil de separação 100 mL de amostra e 4 vezes de 10 mL de acetato de etila, posteriormente evaporou-se 1 mL da fase orgânica em fluxo de nitrogênio, e reconstituiu-se em 2,5 mL de água de osmose com 0,2% de acetonitrila.

#### 4.3.3 Análise quantitativa do clorpirifós por HPLC-DAD

Em trabalho realizado anteriormente no grupo de pesquisa (UTZIG, 2016), foi validado o método de análise quantitativa do CP por HPLC-DAD. Utilizando a mesma coluna cromatográfica (Poroshell 120 EC-C18 4,6x150 mm; 2,7  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies), pré-coluna (Poroshell 120 SB-C18 2,1x5 mm; 2,7  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies) e o mesmo cromatógrafo (1260 Infinity, Agilent) equipado com bomba quaternária (G1311B), injetor automático (G1329B) e detector DAD (G4212B), realizou-se a verificação do coeficiente angular da curva analítica, pela análise de três concentrações em triplicata (20, 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), além da confirmação do tempo de retenção do analito (CP).

Após a verificação, observou-se que poderiam ser utilizados os parâmetros de análise anteriormente validados por Utzig (2016). Os parâmetros da curva analítica são mostrados no Anexo C. As condições do método cromatográfico estão descritas no Quadro 2.

A fase móvel, acetonitrila e água ultrapura, foram sonicadas em ultrassom por 15 minutos, com a finalidade de remover a presença de gases dissolvidos. Registrou-se os cromatogramas em varredura de 190 a 400 nm, com intervalos de 2 nm, sendo monitorado o CP em 290 nm.

**Quadro 2 – Condições do método cromatográfico estabelecido para detecção e quantificação do clorpirifós em água com 0,2% de acetonitrila.**

Fase móvel	Acetonitrila:H <sub>2</sub> O
Proporção da fase móvel	90:10 (v/v)
Vazão da fase móvel	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Tipo de eluição	Isocrática
Volume de injeção	50 µL
Comprimento de onda monitorado	290 nm
Tempo de corrida cromatográfica	15 minutos

Fonte: Utzig (2016).

#### 4.4 BIOENSAIOS

##### 4.4.1 Ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os ensaios com *Daphnia magna* foram realizados seguindo a NBR 12713/2016 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016). Dez organismos neonatos (2-26h) foram colocados em béqueres de 50 mL contendo 20 mL de amostra/controlado negativo. Todas as amostras e controles foram testadas em triplicata (n=3). O controle negativo foi feito com água de diluição de *D. magna* (constituintes da água de diluição descritos no Anexo D).

As amostras foram incubadas em câmara de germinação a 20±2°C, sem fotoperíodo, e após 48 horas foram contabilizados os organismos imóveis em cada frasco. Segundo a norma, imobilidade acima de 10% dos organismos classifica a amostra como tóxica.

Os resultados foram expressos em função da porcentagem de imobilização. A carta controle dos testes de sensibilidade de *D. magna*, utilizando sulfato de zinco heptahidratado, está apresentada no Anexo E.

#### 4.4.2 Fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

Os ensaios de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram baseados na metodologia descrita por Sobrero e Ronco (2004) e Young et al. (2012). O teste consistiu na disposição de 15 sementes (Boston branca, Isla Pak<sup>®</sup>) sobre um papel filtro (80 g m<sup>-2</sup>, Unifil) com 4 mL de amostra em placa de Petri de 10 cm de diâmetro. As placas foram seladas com filme plástico e incubadas em câmara de germinação a 20±2°C, sem fotoperíodo, por 120 horas.

Como controle negativo foi utilizado água de osmose reversa (Quimis), e como controle positivo solução de glifosato comercial (48% m/v) a 6%. Todas as amostras e controles foram feitos em triplicata (n=3).

Após o período de exposição, o comprimento das radículas foi medido com precisão de uma casa decimal. Radículas com crescimento inferior a 0,3 cm são consideradas não germinadas. Calculou-se a média de comprimento de cada replicata, bem como o desvio padrão (DP). Os resultados foram avaliados através do índice de crescimento relativo (ICR) (Equação 6) e índice de germinação (IG) (Equação 7) (GARCIA et al., 2009).

$$ICR = \frac{\text{média do comprimento das radículas da amostra}}{\text{média do comprimento das radículas do controle negativo}} \quad (6)$$

$$IG = \frac{\text{média da germinação de cada réplica da amostra}}{\text{média da germinação de cada réplica do controle negativo}} \times 100 \quad (7)$$

De acordo com Young et al. (2012), conforme o valor obtido para o ICR, a amostra é classificada do seguinte modo:

- inibição do crescimento da radícula (I):  $0 < ICR < 0,8$
- efeito não significativo (NS):  $0,8 \geq ICR \leq 1,2$
- estimulação do crescimento da radícula (E):  $ICR > 1,2$

Os resultados foram analisados estatisticamente com o auxílio do *software* livre BioEstat<sup>®</sup>, através da análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett, onde letras iguais demonstram que as amostras não foram consideradas significativamente diferentes (comparação entre amostra e controle).

#### 4.4.3 Atividade larvicida em *Aedes aegypti*

Os testes foram realizados com larvas de *Aedes aegypti*, seguindo a metodologia para determinação da suscetibilidade ou resistência da larva à inseticidas, determinado pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981), com adaptações de Utzig (2016). Utilizou-se ovos sadios de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller, cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE, Instituto Oswaldo Cruz – RJ).

Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em béquer com 500 mL de água mineral, mantidos a 28°C com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, em câmara de germinação. Para alimentação das larvas foi utilizado ração para peixe (MEP200 Complex, Alcom Basic®). Para os bioensaios utilizaram-se as larvas após aproximadamente 96 horas de eclosão dos ovos, entre o 3° e 4° instar (BAR; ANDREW, 2013; CHRISTOPHERS, 1960).

Os testes foram realizados em béqueres de 50 mL com 25 mL de solução e 20 organismos por réplica (n=4). O controle foi feito com água de osmose e todos os béqueres foram mantidos a 23°C, sem fotoperíodo, em câmara de germinação por 24 horas. Após as 24 horas de exposição das larvas às soluções, verificou-se a taxa de imobilidade (T.I.) das mesmas, e o resultado obtido foi expresso em % de imobilidade (Equação 8).

$$T.I. = \frac{\% \text{ mortalidade do ensaio} - \% \text{ mortalidade do controle} \times 100}{100 - \% \text{ mortalidade do controle}} \times 100 \quad (8)$$

Ao final dos ensaios, todas as larvas foram expostas à solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v).

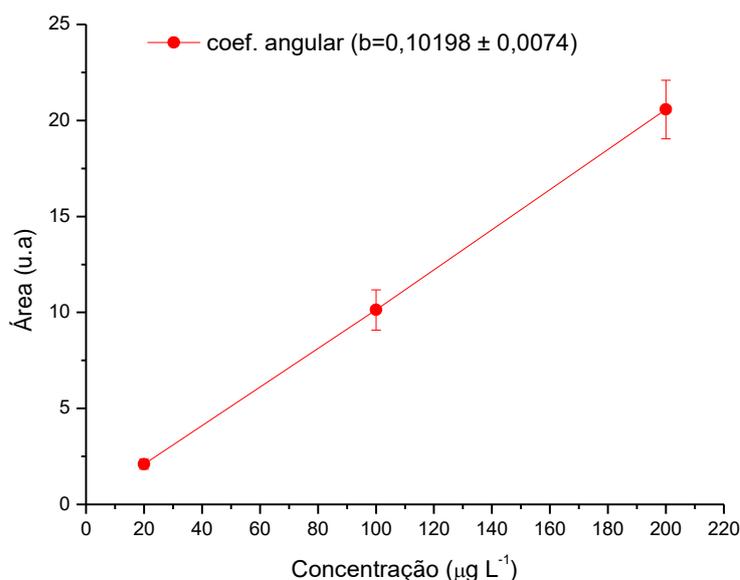
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 VERIFICAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para verificação do tempo de retenção ( $T_R$ ) do clorpirifós, e a conformidade do coeficiente angular, realizou-se a análise cromatográfica do CP nas mesmas condições e equipamento anteriormente utilizado no grupo de pesquisa (descrito no item 4.1.6). Em relação ao  $T_R$ , verificou-se aproximadamente o mesmo (8,3 e 8,6 min), e com o mesmo perfil espectral.

Para verificação da conformidade do coeficiente angular, utilizando três concentrações da curva de calibração, 20, 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  (baixa, média e alta concentração, respectivamente), obteve-se um coeficiente angular de  $0,10198 \pm 0,0074$  (Figura 11), demonstrando que este está contido dentro da variação obtida por Utzig (2016), de  $0,10262 \pm 0,0038$  (Anexo C), permitindo desta forma, dar continuidade ao trabalho, utilizando valores de validação já obtidos anteriormente.

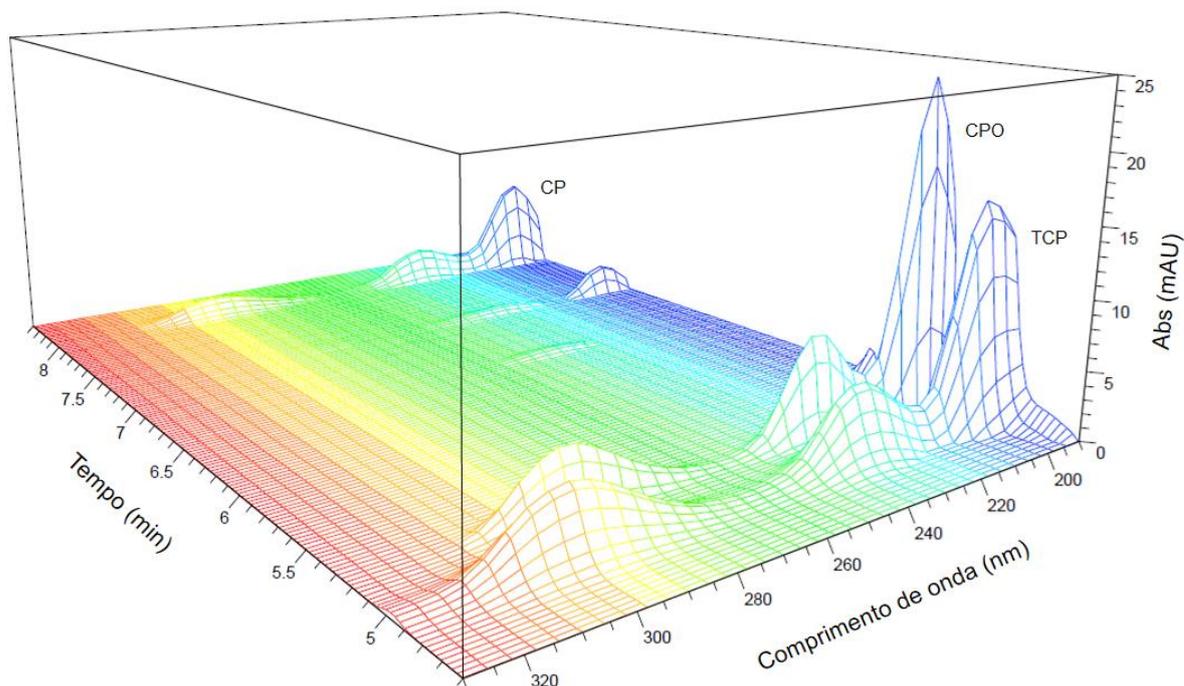
Figura 11 – Equação de regressão para verificação do método cromatográfico.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 12 pode ser visto o cromatograma tridimensional do CP, CPO e TCP, com tempos de retenção distintos, de 8,3, 5,2 e 4,9 minutos, respectivamente.

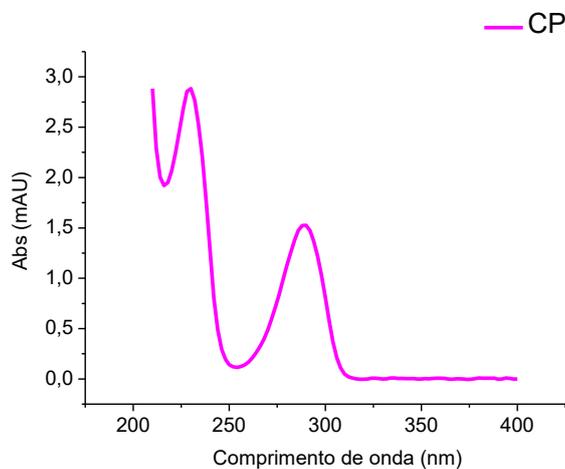
**Figura 12 - Cromatograma tridimensional do CP, CPO e TCP em água e 0,2% de acetonitrila (eluição 90:10 de ACN:H<sub>2</sub>O, vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>).**



**Nota:** Utilizou-se coluna Poroshell 120 EC-C18 4,6x150 mm; 2,7  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies).  
**Fonte:** Autoria própria.

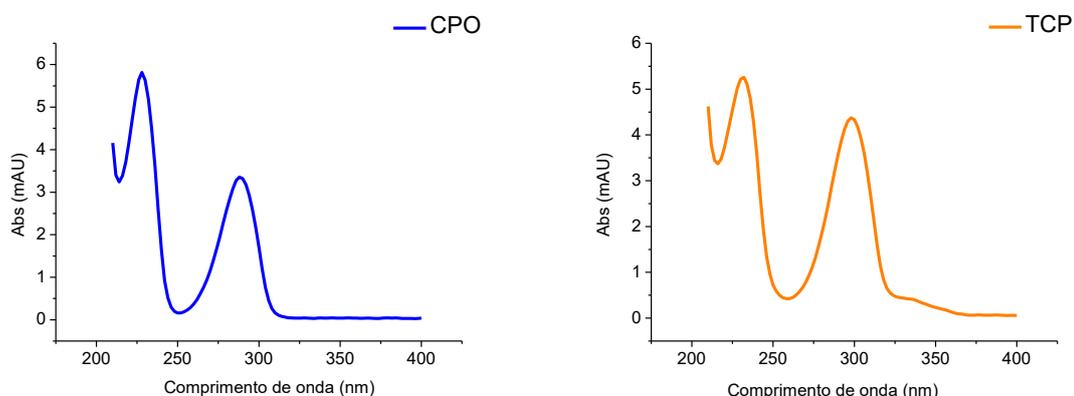
Na Figura 13 está o espectro UV do CP, e na Figura 14 estão os espectros UV do CPO e TCP. Diante destes espectros, percebe-se a similaridade entre eles, no entanto, eles não são iguais, e as pequenas diferenças apresentadas, junto aos diferentes  $T_R$ , possibilitam determinar a presença ou ausência de CPO e TCP, nos cromatogramas referente às degradações.

**Figura 13 - Espectro UV do CP (em água e 0,2% de acetonitrila, eluição 90:10 de ACN:H<sub>2</sub>O e vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>).**



**Fonte:** Autoria própria.

**Figura 14 - Espectros UV do CPO e TCP (em água e 0,2% de acetonitrila, eluição 90:10 de ACN:H<sub>2</sub>O e vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>).**



**Fonte: Autoria própria.**

## 5.2 DEGRADAÇÃO DO LORSBAN<sup>®</sup> POR PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Em relação ao consumo de peróxido de hidrogênio no decorrer dos processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se uma constância residual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menor que 10% em cada leitura (realizadas inicialmente a cada 15 minutos até 120 minutos, posteriormente a cada 30 minutos), indicando um consumo regular de mais de 90% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cada amostra, valores demonstrados na Tabela 1. Lembrando que era readicionado 100 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cada 15 minutos de processo.

**Tabela 1 - Concentração residual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Amostras do processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (min)	Concentração residual de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Amostras do processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (min)	Concentração residual de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
15	6,42	210	7,83
30	6,66	240	9,36
45	4,02	270	8,68
60	3,90	300	9,00
75	6,27	330	9,20
90	4,73	360	9,83
105	9,44	390	6,04
120	8,00	420	6,39
150	7,33	450	6,66
180	7,69	480	6,43

**Fonte: Autoria própria.**

É importante monitorar o consumo de  $H_2O_2$  para não haver uso desnecessário de reagente (FEMIA et al., 2013), bem como para que não haja excesso de  $H_2O_2$  no meio reacional, pois este pode atuar como sequestrante de radicais hidroxila, formando assim o radical hidroperoxila ( $\cdot OH_2$ ), que tem um menor potencial de oxidação ( $E^0_{ox}=1,42$  V), prejudicando desta forma o processo de degradação (BOCZKAJ; FERNANDES, 2017; BRITO; SILVA, 2012; PUPO NOGUEIRA et al., 2007).

Após os tratamentos por UV/ $H_2O_2$  (cromatogramas expostos na Figura 15), notou-se a eficácia dos mesmos visto que após 30 minutos de tratamento, observou-se uma concentração residual de CP de  $3,51 \mu g L^{-1}$ , indicando uma eficiência de 98,24% de degradação do princípio ativo.

A partir de 60 minutos de processo, a degradação do CP foi maior que 99,99%, não sendo possível detectar a presença do ingrediente ativo, devido ao limite de detecção do método ( $LD = 0,02 \mu g L^{-1}$ ), utilizando um fator de concentração (FC) de 250 vezes.

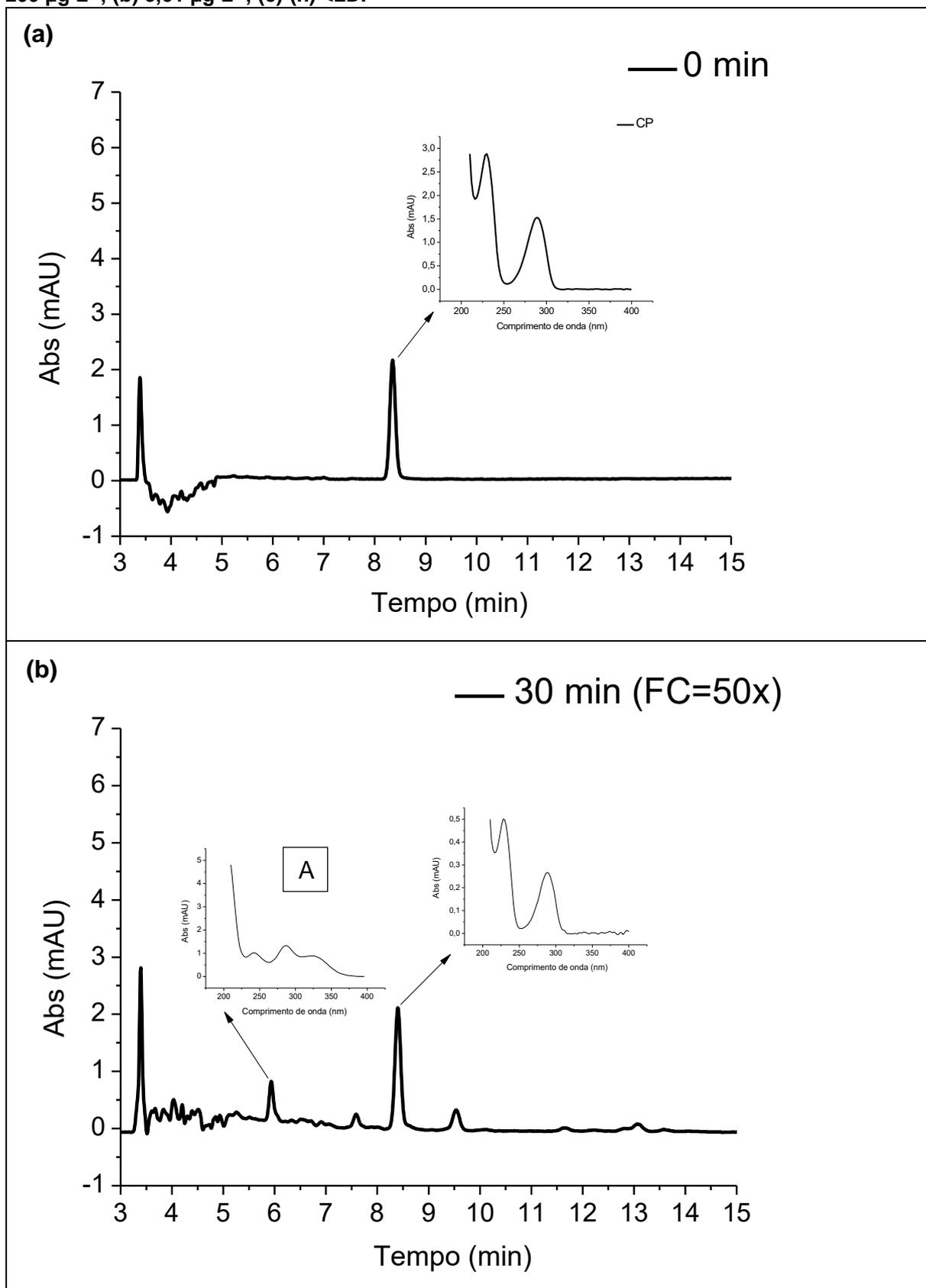
Em relação aos subprodutos formados, foi feita uma análise do tempo de retenção e perfil espectral destes compostos, onde espectros iguais foram marcados por letras iguais (Figura 14). Por exemplo, o clorpirifós-oxon (CPO) apareceu nas amostras de 60 e 240 minutos, sendo marcado em ambos com a letra "B".

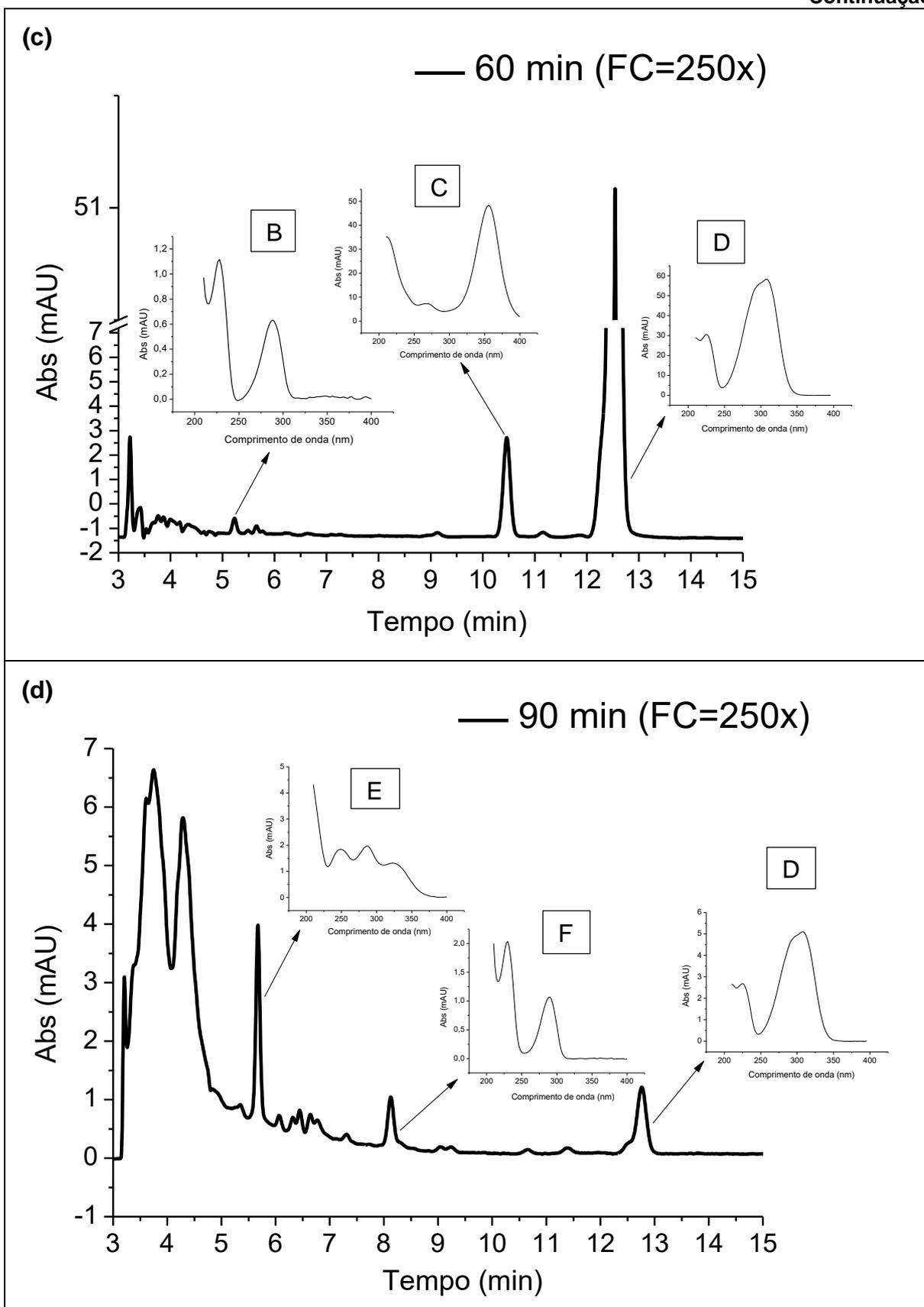
Outros subprodutos de degradação do Lorsban<sup>®</sup> foram observados mais de uma vez durante os tratamentos, por exemplo, os mesmos espectros UV, nos tempos de aproximadamente 10,4 e 12,5 minutos, podem ser vistos nas degradações de 60, 120, 240, 360 e 480 minutos (subprodutos marcados com as letras "C" e "D"), no entanto, a técnica analítica utilizada neste estudo (HPLC-DAD) não permite a identificação dos subprodutos gerados após as degradações.

Demais picos observados nos cromatogramas não apresentam a demarcação de letras pois não haviam espectros UV bem definidos para realizar possíveis comparações.

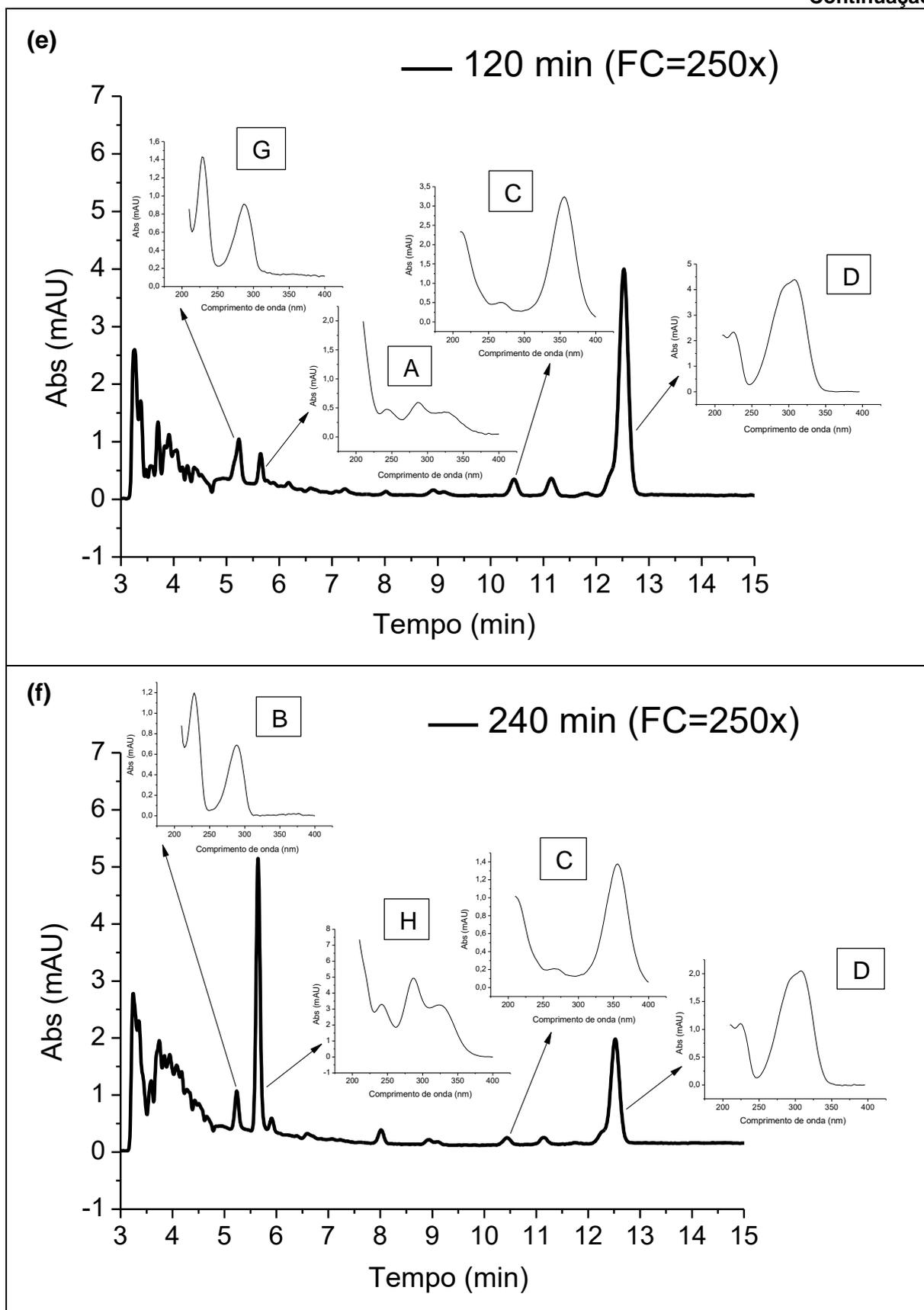
O 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), metabólito da hidrólise direta do CP e/ou da hidrólise do CPO (ANWAR et al., 2009; PELIT et al., 2012; ROBLES-MOLINA et al., 2012), não foi detectado em nenhuma amostra. Caso o TCP tenha sido formado, devido a sua alta solubilidade em água ( $80,9 mg L^{-1}$  a  $25^\circ C$ ) ele pode não ter sido extraído no processo de extração líquido-líquido aplicado neste experimento.

Figura 15 - Cromatogramas de degradações do Lorsban® por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (eluição 90:10 de ACN:H<sub>2</sub>O, vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup> e monitoramento em 290 nm). Concentração de clorpirifós: (a) 200 µg L<sup>-1</sup>; (b) 3,51 µg L<sup>-1</sup>; (c)-(h) <LD.

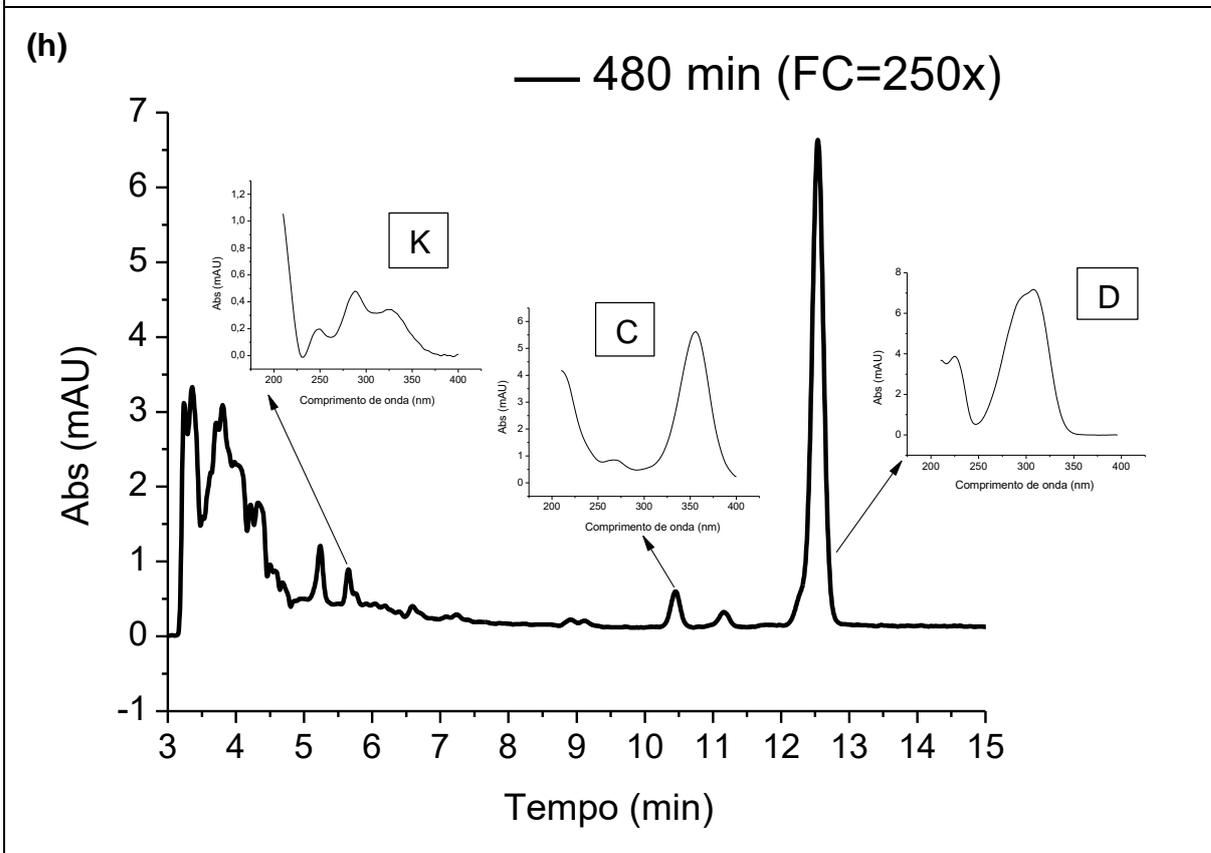
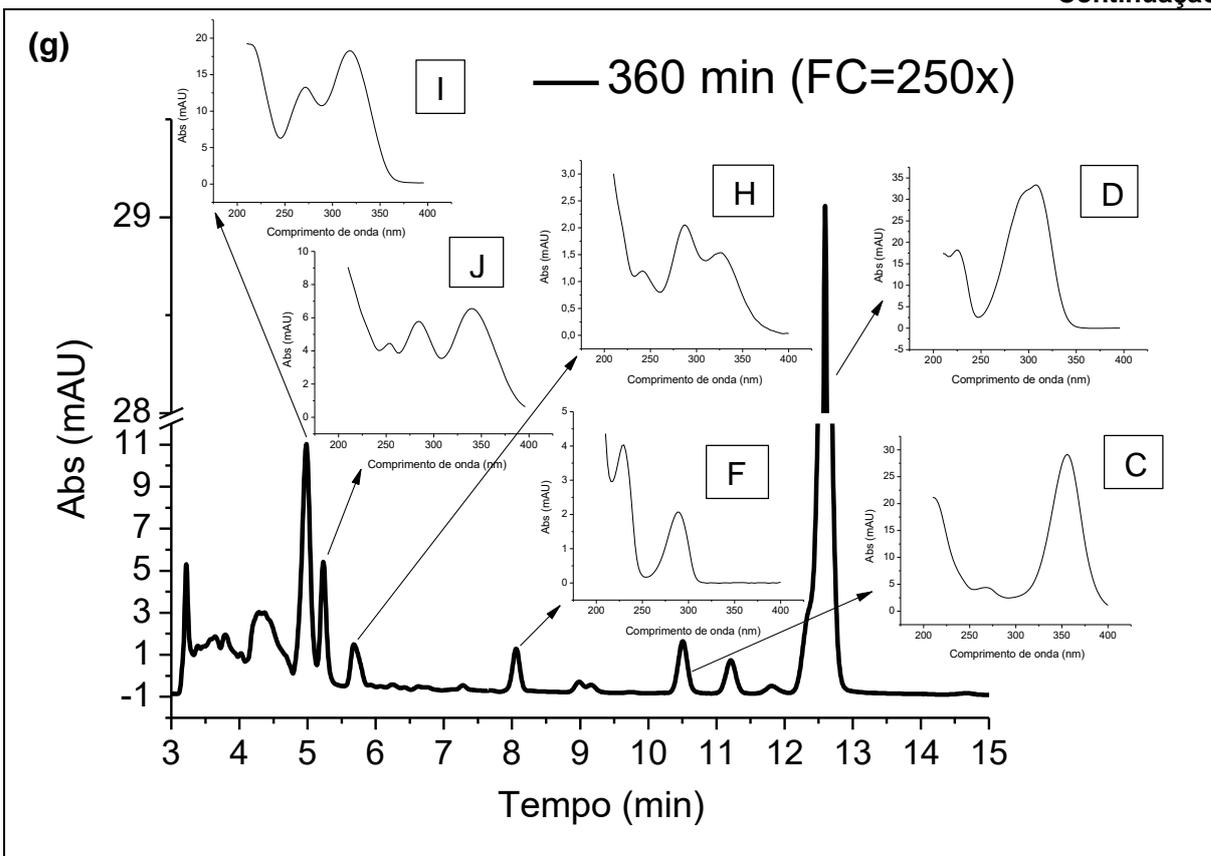




Continuação



Continuação



Fonte: Autoria própria.

Robles-Molina et al. (2012) degradaram CP (padrão analítico) em reator eletroquímico de bancada (capacidade de 5 L, ânodo de diamante e cátodo de aço inoxidável, por 12 horas, e concentrações de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  -  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), e observaram de forma similar a este estudo, que a degradação do CP chegou ao LD do método, independente da concentração inicial do composto ou da corrente aplicada. Durante as reações foram identificados seis subprodutos, entre os quais o CPO e TCP. Sendo utilizado cartuchos  $C_{18}$  (Bond elut<sup>®</sup> 500 mg) para a extração em fase sólida, diferente deste estudo, onde foi realizada a extração líquido-líquido.

Em seu trabalho, Robles-Molina et al. (2012) sugerem a formação do CPO a partir da oxidação da dupla ligação (P=S) do CP. Outras explicações para os demais subprodutos formados são: dietil hidrogeno fosfato tem alta polaridade, sendo sugerido que é formado a partir de uma primeira hidrólise da molécula de CPO, já o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) seria formado a partir da segunda hidrólise da molécula de CPO; o subproduto etil 3,5,6-tricloropiridin-2-il hidrogeno fosfato poderia ser formado a partir da perda de um grupo etil da molécula do CPO; O,O-dietil O-hidrogeno fosforotioato seria formado a partir da hidrólise do CP com o TCP; já o O-etil O-3,5,6-tricloropiridin-2-il O-hidrogeno fosforotioato poderia ser formado pela perda de um grupo etil da molécula de CP (ROBLES-MOLINA et al., 2012).

O uso da técnica HPLC-DAD não nos permite afirmar se algum destes compostos também foi formado no presente trabalho, pois Robles-Molina et al. (2012) utilizaram uma identificação de estruturas por HPLC-TOFMS, não sendo encontrados espectros UV destes compostos, mas corrobora a hipótese de que alguns dos subprodutos observados na Figura 15 podem ser derivados do CP, porém, também poderiam ser atribuídos à subprodutos formados a partir dos compostos da formulação do Lorsban<sup>®</sup>.

Em relação aos tempos de degradação, se analisarmos resultados da literatura, como por exemplo no trabalho de Utzig (2016), que realizou a degradação do CP padrão analítico ( $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), por processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , durante 180 minutos (em reator de 250 mL e lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio de 125 W, alocada a 10 cm da borda do reator), foi possível detectar o CP em até 20 minutos, e quantificar em até 10 minutos de tratamento ( $30,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), mesmo sem aplicação de concentração da amostra, representando uma degradação de 84,98%.

Femia et al. (2013) realizaram a degradação do CP comercial ( $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), pelo processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 4 horas, em reator anular de quartzo com capacidade de

1,2 L e lâmpada de 20 W ( $\lambda=253,7$  nm). Após 40 minutos de tratamento, houve uma degradação do composto superior a 99%.

Na degradação do Lorsban® ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (em reator de 600 mL e lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio de 125 W, posicionada a 10 cm da borda do reator), Lima (2017) degradou 96,4% do CP em 20 minutos de reação, 98% em 120 minutos, e, em 180 minutos não foi mais detectado o composto mesmo usando um fator de concentração de 10x.

No exemplo acima, torna-se evidente a maior eficiência do método estudado, visto que as condições da lâmpada e reator são as mesmas. Estes dados corroboram com a hipótese do sistema, de que quando a lâmpada é mergulhada na solução o processo se torna mais eficiente, quando comparado aos testes realizados com a lâmpada posicionada de forma superficial. E, quando comparado com trabalhos de degradação do produto comercial, observa-se uma tendência do CP em demorar mais tempo para ser tratado, o que pode ser atribuído ao consumo dos radicais gerados para tratar os demais compostos da formulação.

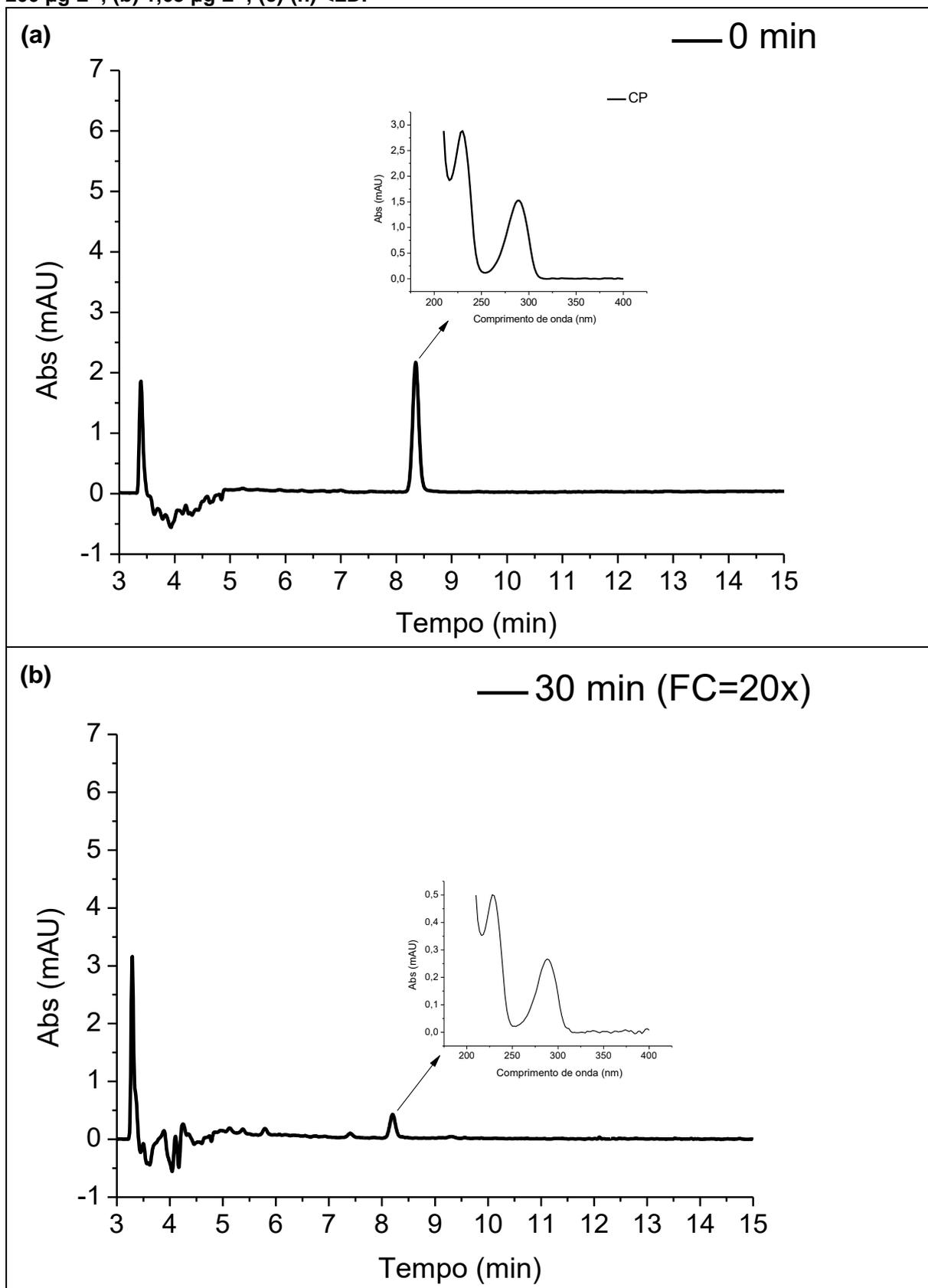
### 5.3 DEGRADAÇÃO DO LORSBAN® POR FOTÓLISE UVC

Nos processos de fotólise UVC (cromatogramas expostos na Figura 16), percebe-se que o tratamento também se mostrou eficiente para a degradação do clorpirifós. Em 30 minutos de processo observou-se uma concentração residual de CP de  $1,65 \mu\text{g L}^{-1}$ , representando uma eficiência de 99,18% de degradação.

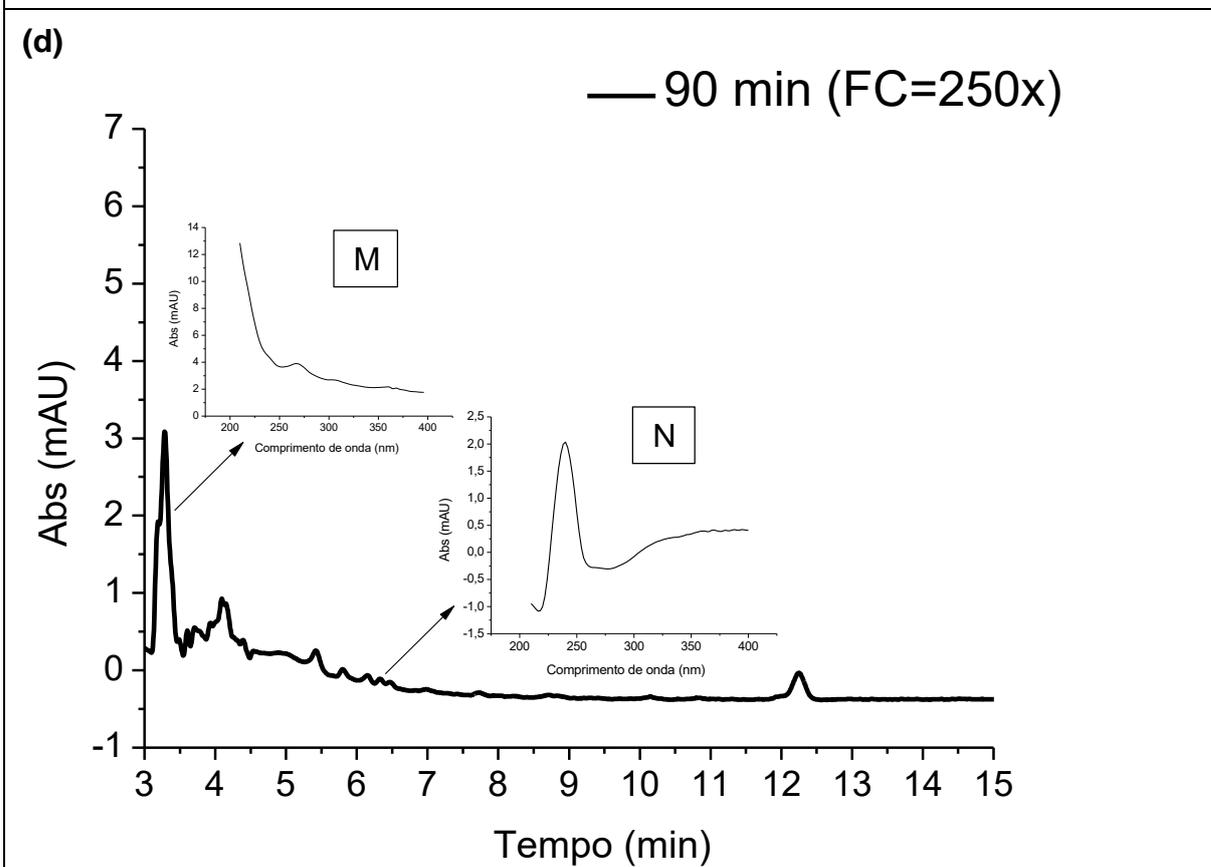
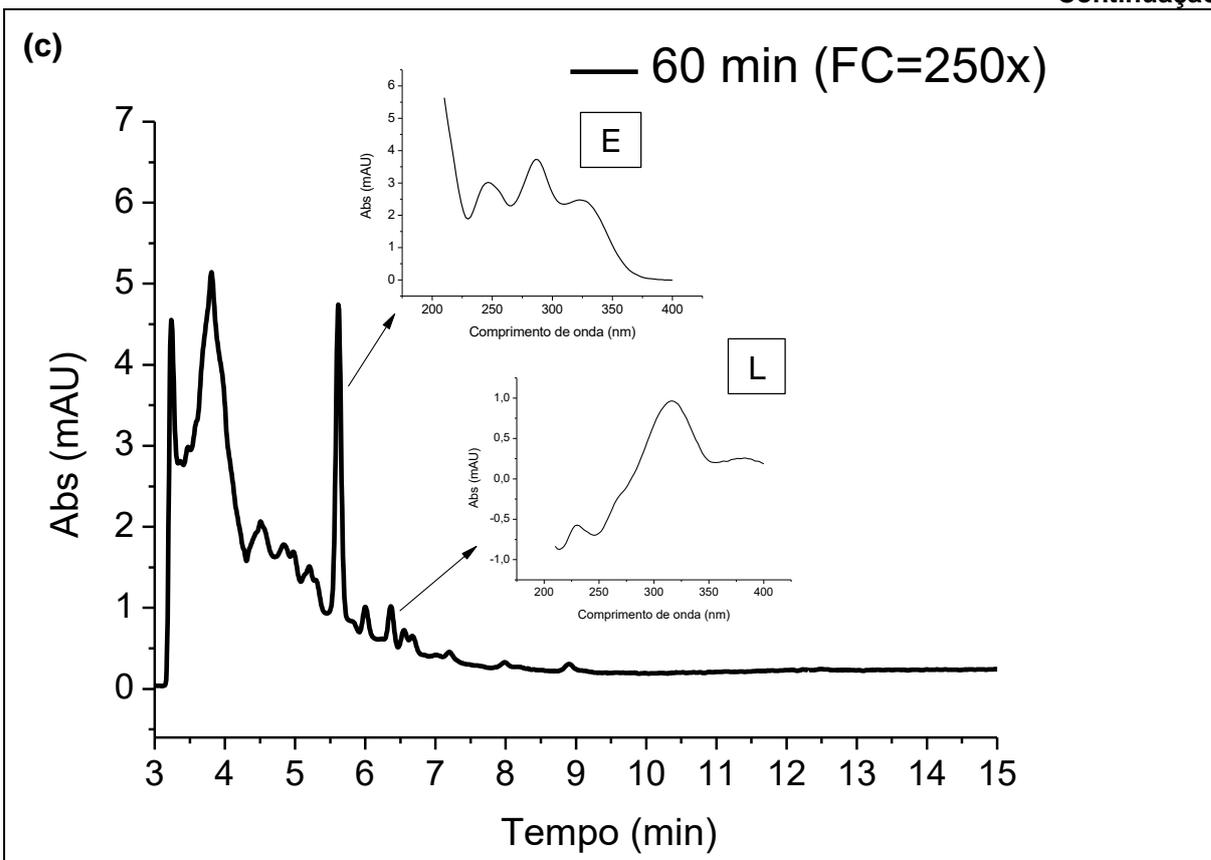
No tratamento de 60 minutos em diante, a concentração do CP foi inferior ao LD de  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ , não sendo mais observado sinal referente ao CP, indicando que a degradação do princípio ativo foi maior que 99,99%.

Na Figura 15 pode-se observar a presença de vários subprodutos de degradação, em diversos tempo de tratamento, inclusive CPO em 240 e 480 minutos. Para compostos já observados no tratamento UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como o CPO, estes foram marcados na Figura 16 com a mesma letra utilizada na Figura 15, e novos subprodutos foram marcados com letras sequenciais às utilizadas na Figura 15.

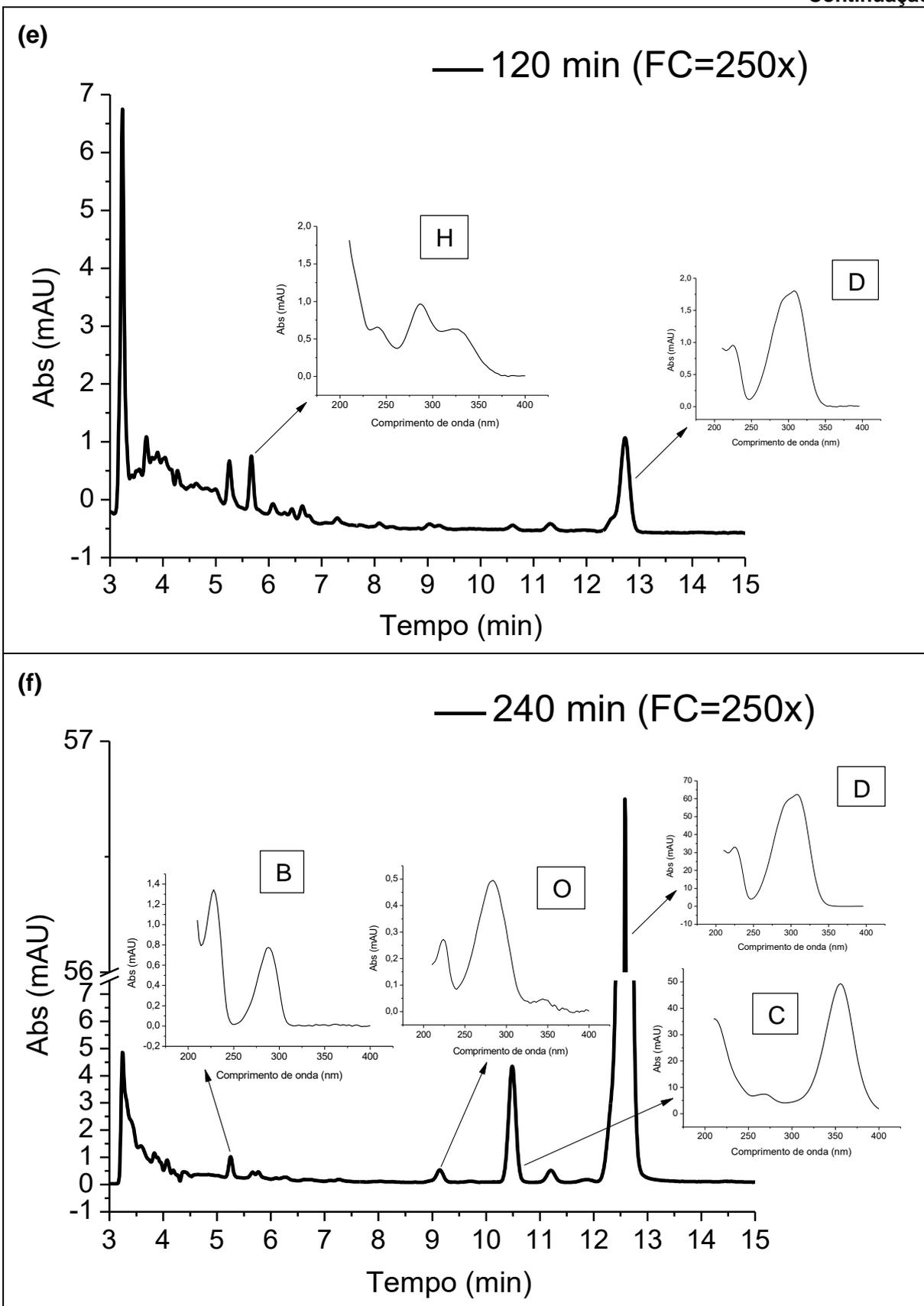
Figura 16 - Cromatogramas de degradações do Lorsban® por fotólise UVC (eluição 90:10 de ACN:H<sub>2</sub>O, vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup> e monitoramento em 290 nm). Concentração de clorpirifós: (a) 200 µg L<sup>-1</sup>; (b) 1,65 µg L<sup>-1</sup>; (c)-(h) <LD.



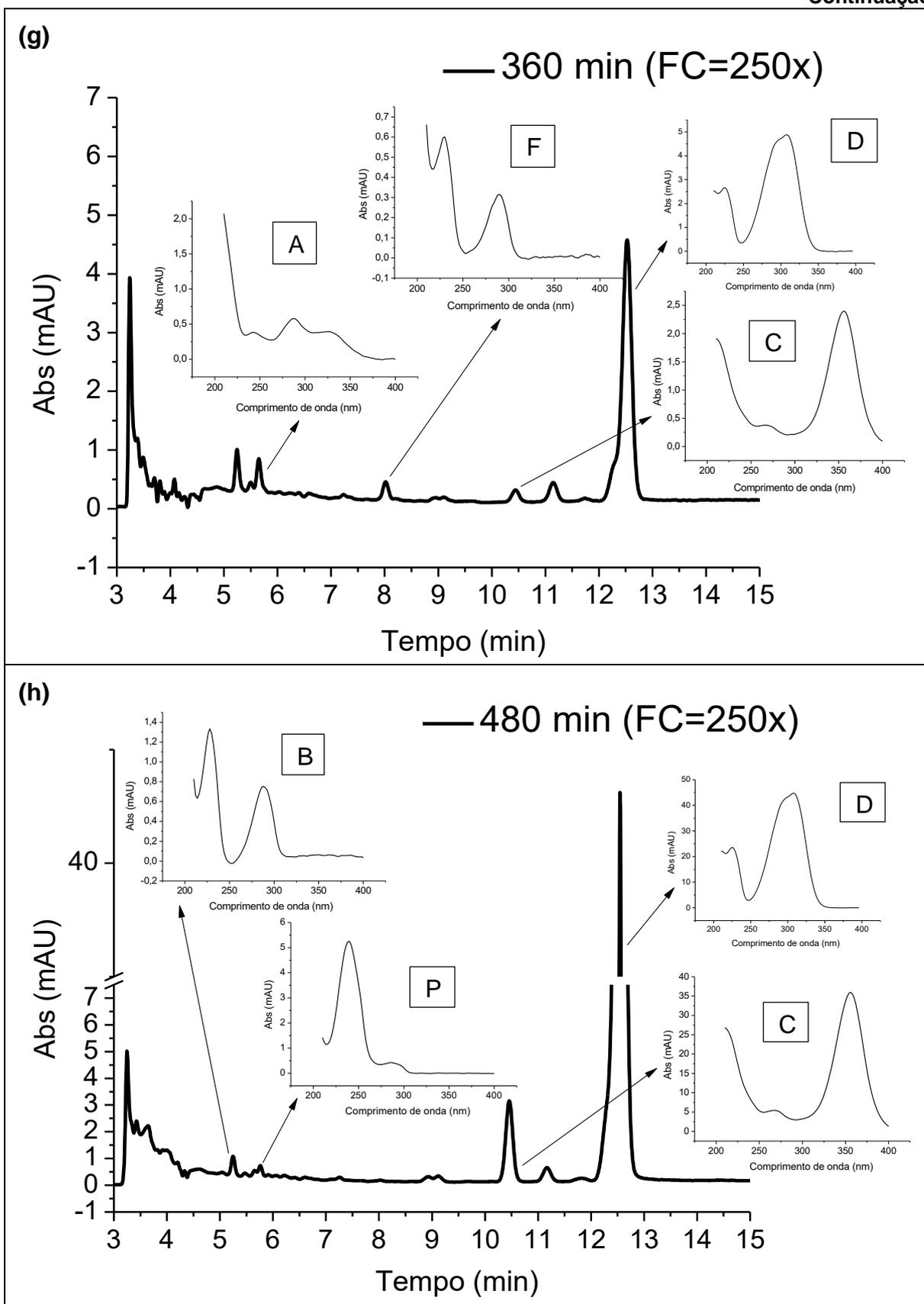
Continuação



Continuação



Continuação



Fonte: Autoria própria.

Assim como no processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o TCP também não foi detectado em nenhuma amostra da fotólise UVC, provavelmente pelos mesmos motivos já discutidos anteriormente.

Alguns dos subprodutos do tratamento por fotólise UVC (demonstrados na Figura 16) podem ser observados mais de uma vez, por exemplo, nos tempos de 240, 360 e 480 minutos, observa-se o mesmo espectro UV (marcado com a letra “C”) em aproximadamente 10,4 minutos. Em 120, 240, 360 e 480 minutos de degradação, observa-se o mesmo espectro UV (marcado com a letra “D”) em aproximadamente 12,5 minutos. Estes mesmos espectros são observados como subprodutos de degradação de ambos os processos, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, inferindo que as rotas de formação destes dois compostos são favorecidas.

Além de serem observados como subproduto de ambos os processos, o espectro UV marcado com a letra “D”, é formado em quantidade muito superior em alguns tempos, visto as unidades de absorvância (mAU) dos cromatogramas. Exemplos desta situação podem ser vistos nos tempos de 60 e 360 minutos do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e nos tempos de 240 e 480 minutos da fotólise UVC.

Os tempos de retenção (T<sub>R</sub>) dos subprodutos gerados na degradação do Lorsban<sup>®</sup> (demarcados com as letras de “A” à “P”), de ambos os processos, estão demonstrados na Tabela 2. Lembrando que demais picos observados nos cromatogramas, não apresentam a demarcação de letras pois não haviam espectros UV bem definidos para realizar possíveis comparações.

**Tabela 2 - Tempo de retenção aproximado dos subprodutos de degradação do Lorsban<sup>®</sup>, de ambos os processos de tratamento (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC).**

Subproduto de degradação do Lorsban <sup>®</sup>	T <sub>R</sub> (min)	Subproduto de degradação do Lorsban <sup>®</sup>	T <sub>R</sub> (min)
A	5,8	I	4,7
B	5,2	J	5,2
C	10,4	K	5,6
D	12,5	L	6,3
E	5,6	M	3,2
F	8,0	N	6,3
G	5,2	O	9,1
H	5,6	P	5,7

Fonte: Autoria própria.

Conforme já mencionado na discussão dos resultados do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sobre os subprodutos de degradação do CP, além de Robles-Molina et al. (2012), outros trabalhos também citam possíveis compostos formados em estudos de degradação do CP (BORRÁS et al., 2015; PINTO et al., 2015; SLOTKIN et al., 2009), no entanto, não foi localizado nenhum trabalho envolvendo os espectros UV dos possíveis subprodutos, para que fosse possível a verificação da compatibilidade dos resultados obtidos com dados da literatura.

De forma similar a este estudo, Pinto et al. (2015) realizaram a fotólise UVC do CP padrão analítico, em reator de 300 mL e concentração inicial de 1 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, foi utilizado extração em fase sólida Oasis HLB<sup>®</sup> (60 mg), enquanto no presente estudo, foi utilizada a extração líquido-líquido. Desta forma, constataram a completa degradação do CP após 60 minutos de tratamento, sendo o principal subproduto gerado o TCP, e a presença de CPO não foi detectada, ao contrário dos resultados observados neste trabalho.

No trabalho de Borrás et al. (2015), foi realizado a degradação atmosférica de CP e CPO (fotólise solar) em câmaras EUFORE, que são projetadas para simular condições atmosféricas. Após a degradação dos compostos foram identificados quinze subprodutos de degradação do CP, e nove subprodutos de degradação do CPO. Sendo sugerido que as moléculas parcialmente oxidadas mantiveram as estrutura central do CP, sendo modificado principalmente a dupla ligação de P=S por P=O, ou então, O-CH<sub>3</sub> por OH.

Slotkin et al. (2009) realizaram a fotólise UVC do CP padrão analítico (solubilizado em metanol), em reator colimado de bancada com quatro lâmpadas de mercúrio de baixa pressão ( $\lambda=254$  nm), e concentração inicial de CP de 550 mg L<sup>-1</sup>. Após 60 e 120 minutos de tratamento, houve uma redução de 50% e 70%, respectivamente. A quantificação do CP foi realizada em HPLC-DAD, no entanto, a análise dos subprodutos foi realizada em GC-MS, onde observou-se a presença de sete metabólitos, entre eles o CPO, de forma similar a este estudo.

Em relação especificamente ao monitoramento da degradação do CP, no trabalho realizado por Utzig (2016), em 180 minutos de degradação do CP padrão analítico, com concentração inicial de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foi possível quantificar o CP em até 60 minutos de tratamento pós fotólise UVC. Obteve-se uma concentração residual de CP de 15,18  $\mu\text{g L}^{-1}$ , indicando uma degradação de 92,41%.

Femia et al. (2013) realizaram a fotólise de 4 L de uma solução de CP comercial ( $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) por 4 horas, em reator anular de quartzo, com capacidade de 1,2 L e lâmpada de 20 W ( $\lambda=253,7 \text{ nm}$ ). Após 120 minutos de tratamento houve uma degradação de aproximadamente 90% do CP.

Lima (2017) degradou Lorsban® (concentração inicial de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) por 180 minutos, em reator de 600 mL, por fotólise UVC e lâmpada de alta pressão de vapor de mercúrio de 125 W (posicionada a 10 cm da borda do reator), e quantificou CP após 180 minutos de tratamento, usando um fator de concentração de 10x. Obteve-se uma concentração residual de CP de  $2,33 \mu\text{g L}^{-1}$ , indicando uma eficiência de degradação de 98,72%.

Novamente os resultados corroboram com a hipótese de que o tratamento é mais rápido com a lâmpada mergulhada na solução. Ainda, principalmente no trabalho desenvolvido por Femia et al. (2013), observa-se que o uso de uma lâmpada de menor potência afeta fortemente o processo de degradação, alcançando valor consideravelmente inferior de degradação do CP.

Comparando os resultados de Femia et al. (2013), Lima (2017) e Utzig (2016), sobre a degradação do CP perante os processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, percebe-se uma grande discrepância nas taxas de degradações, e, desta forma, observa-se que nestes três trabalhos o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstrou-se mais eficiente que a fotólise UVC. Esta eficiência sobressalente do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foi observada no presente estudo. Visto as taxas de degradação obtidas em 30 minutos de processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC (98,24% e 99,18%, respectivamente), percebe-se que não houve grande discrepância entre os tratamentos, como foi observado nos resultados da literatura, este fato pode estar atrelado à lâmpada estar mergulhada nas soluções, proporcionando uma radiação UVC efetiva diferente entre os processos.

Além dos processos avaliados neste trabalho, há relatos na literatura da aplicação de outros AOPs na degradação do CP, como TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, foto-Fenton, TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>/UV, entre outros, sendo que a grande maioria prioriza a degradação do princípio ativo, sem preocupação com o monitoramento em relação à toxicidade do efluente gerado ao longo dos processos (AMIRI et al., 2018; MURILLO et al., 2010; THIND; KUMARI; JOHN, 2018).

Neste sentido, no presente trabalho, foram realizados bioensaios para averiguar a possível toxicidade das amostras geradas nos diversos tempos já citados, sendo analisados os resultados para *Daphnia magna*, sementes de *Lactuca sativa* e

larvas de *Aedes aegypti*, discutidos na próxima seção.

## 5.4 BIOENSAIOS

### 5.4.1 Ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os resultados dos testes de ecotoxicidade aguda com *D. magna* e amostras de Lorsban®, pré e pós processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, estão expressos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente, em função da média de organismos imóveis (MOI) e porcentagem de imobilização.

Na Tabela 3, amostras pós processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode-se observar que apenas no último tempo de tratamento (480 minutos) a toxicidade diminuiu de 100% para 63,33%.

**Tabela 3 - Resultado dos testes de ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna* e amostras de Lorsban® após processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Processo / Amostra		MOI	Imobilização (%)	DPR	CV (%)
Controle negativo		0	0	0	0
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0 min	10	100	0	0
	30 min	10	100	0	0
	60 min	10	100	0	0
	90 min	10	100	0	0
	120 min	10	100	0	0
	240 min	10	100	0	0
	360 min	10	100	0	0
	480 min	6,33	63,33	15,28	24,12

**Nota:** MOI: média de organismos imóveis (n=3); DPR: desvio padrão relativo; CV: coeficiente de variação. Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 4, após tratamento por fotólise UVC, observa-se uma diminuição da toxicidade em 120 minutos, de 100% para 30%, depois aumenta para 100% em 240

minutos, em 360 minutos diminui para 40%, e novamente ocorre um aumento para 100% em 480 minutos.

**Tabela 4 - Resultado dos testes de ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna* e amostras de Lorsban® após tratamentos por fotólise UVC.**

Processo / Amostra		MOI	Imobilização (%)	DPR	CV (%)
Controle negativo		0	0	0	0
Fotólise UVC	0 min	10	100	0	0
	30 min	10	100	0	0
	60 min	10	100	0	0
	90 min	10	100	0	0
	120 min	3	30	17,32	57,74
	240 min	10	100	0	0
	360 min	4	40	10,00	25,00
	480 min	10	100	0	0

**Nota: MOI: média de organismos imóveis (n=3); DPR: desvio padrão relativo; CV: coeficiente de variação. Fonte: Autoria própria.**

No tempo 0 minuto (amostra não tratada), de ambos os processos, observou-se 100% de imobilidade. Este comportamento tóxico pode ser explicado devido a estes organismos serem animais e possuírem a enzima acetilcolinesterase, que por sua vez é o principal alvo do mecanismo de ação tóxica do CP. Porém, não pode ser descartado que essa toxicidade também seja atribuída aos componentes da formulação ou, a efeitos sinérgicos destes com o próprio CP, uma vez que estas hipóteses não foram testadas.

Em relação as amostras de 30 minutos, de ambos os processos, observou-se 100% de imobilidade nos organismos-teste. Como foi visto anteriormente nos resultados cromatográficos, a concentração residual de CP era de 3,51  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1,65  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, respectivamente. Considerando a CE<sub>50</sub> do CP padrão para *Daphnia magna* de 0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$  (UTZIG, 2016), usando 0,2% de ACN em água, percebe-se que as concentrações residuais de CP estão acima da CE<sub>50</sub> do CP. Desta forma, pode-se supor que a toxicidade observada nestas amostras foi gerada, a princípio, pelo princípio ativo (CP), no entanto, também pode ser resultado da formação de subprodutos no meio reacional.

Após 60 minutos, em ambos os processos propostos, a concentração do CP é inferior ao seu LD ( $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ ), tendo atingido índice de degradação do princípio ativo superior a 99,99%. Considerando a  $CE_{50}$  do CP de  $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$  (UTZIG, 2016), a toxicidade encontrada não pode ser atribuída à presença de forma isolada de CP em solução. Desta forma, após o tempo de 60 minutos, em ambos os processos, supõe-se que a toxicidade gerada possa estar correlacionada à presença dos compostos utilizados para solubilizar o ingrediente ativo nas formulações comerciais, aos seus subprodutos, bem como aos subprodutos gerados a partir do CP (Figuras 15 e 16).

Pelit et al. (2012) afirmam que o CPO é cerca de 3000 vezes mais tóxico que o próprio CP, na inibição da enzima acetilcolinesterase, neste caso, coincidindo o aumento da toxicidade observada para o teste de *Daphnia magna* exposta aos subprodutos da fotólise UVC nos tempos de 240 e 480 minutos de tratamento.

Sparling e Fellers (2006) avaliaram a toxicidade aguda do CP e CPO, em ensaios com *Rana Boylii* (rã), demonstrando que a mortalidade dos organismos-alvo ocorreu em todas as concentrações superiores a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para o CP, enquanto que para o CPO, concentrações da ordem de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  foram suficientes para causar a mortalidade de 100% dos organismos.

No teste agudo realizado por Utzig (2016) com *D. magna*, para ensaios de degradação do CP padrão analítico ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ), por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, ainda era observada toxicidade nas amostras de 180 minutos. Cabe ressaltar que não foi possível determinar se a concentração do CP já estava inferior a concentração de  $CE_{50}$  ( $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ), para atribuir a toxicidade aos subprodutos, ou se esta toxicidade ainda era remanescente da concentração de CP nas amostras.

Valores de  $CE_{50}$  envolvendo o uso de acetona ou acetonitrila, como solvente orgânico para auxílio na diluição do CP em água (Tabela 5), mostram pequenas variações na toxicidade do CP para diferentes espécies de *Daphnia* e também para diferentes quantidades e tipos de solventes orgânicos usados nos testes, indicando um possível efeito quanto ao solvente presente no meio.

Conforme mostrado na Tabela 5, a  $CE_{50}$  determinada por Lima (2017) para o Lorsban® ( $CE_{50} = 1,4 \times 10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$ ), apresenta uma toxicidade muito superior aos valores determinados para o CP padrão analítico ( $CE_{50}$  da ordem de  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Sugere-se inicialmente que os compostos utilizados na dissolução do CP sejam os principais responsáveis por esse resultado, no entanto, não se sabe quais compostos fazem parte da solução, muito menos após processos de degradação.

**Tabela 5 - Valores de CE<sub>50</sub> relatados na literatura para a espécie *Daphnia*, em testes de toxicidade aguda.**

Organismo	Amostra	CE <sub>50</sub>	Referência
<i>Daphnia magna</i>	CP em água com 0,2% de acetonitrila	0,15 µg L <sup>-1</sup>	UTZIG, 2016
<i>Daphnia carinata</i>	CP em água com acetona	0,24 µg L <sup>-1</sup>	CÁCERES et al. 2007
<i>Daphnia carinata</i>	CP em água com acetona	0,50 µg L <sup>-1</sup>	ZALIZNIAK; NUGEGODA, 2005
<i>Daphnia magna</i>	CP em água com acetona	0,19 µg L <sup>-1</sup>	KIKUCHI; SASAKI; WAKABAYASHI, 2000
<i>Daphnia magna</i>	Não informado	0,16 µg L <sup>-1</sup>	WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009
<i>Daphnia magna</i>	Lorsban®	1,4x10 <sup>-4</sup> µg L <sup>-1</sup>	LIMA, 2017

Fonte: Autoria própria.

Cabe ressaltar, que o CP comercial encontra-se dissolvido em uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos contendo solvente de nafta, mistura de hidrocarbonetos aromáticos pesados e outros ingredientes não especificados no rótulo. Portanto, a interação dos solventes empregados nas formulações podem potencializar os efeitos tóxicos do Lorsban®, dado o volume utilizado destes na solução comercial. Deve-se esperar também, que estes compostos sofram degradação e gerem subprodutos desconhecidos e com toxicidade desconhecida.

A determinação da CE<sub>50</sub> para o Lorsban®, é mais um forte indício de um possível efeito da influência de outros compostos associados ao CP, mas também não pode ser descartado a toxicidade direta destes compostos, uma vez que eles não foram avaliados individualmente.

Como não há estudos referente a toxicidade dos solventes utilizados nas formulações comerciais, pode-se ter uma suposição da toxicidade perante outros solventes relatados na literatura. Esta possibilidade mostrou-se presente mesmo em efeitos crônicos, com baixas concentrações de solventes orgânicos, comuns de laboratório (HUTCHINSON et al., 2006).

Braga (2017) avaliou a exposição da *Daphnia magna* aos solventes etanol e acetona em presença do fungicida tebuconazol, na concentração de 0,5 µg L<sup>-1</sup>, observando efeitos variados conforme a quantidade de solvente era usada, evidenciando efeitos de interação quando o agrotóxico é submetido a diferentes

concentrações do solvente. Para o tebuconazol a literatura relata  $CE_{50}$  com *D. magna*, em teste agudo, de  $631,4 \mu\text{g L}^{-1}$  (CUPERTINI, 2017).

Braga (2017) também realizou testes crônicos, avaliando o efeito dos solventes etanol e acetona, a 0,04%, não sendo observados quaisquer efeitos sobre os organismos-alvo, tornando dúbio o parâmetro da OECD, que estabelece um valor máximo de 0,01% de solvente em testes crônicos, onde são avaliadas alterações na reprodução das *Daphnias* (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2012).

Alguns estudos demonstram que mesmo na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  o CP ainda pode causar toxicidade, como no estudo de Zalizniak e Nugegoda (2005), que avaliaram a toxicidade crônica do CP frente à *Daphnia carinata*, indicando que uma exposição prolongada a  $5 \text{ ng L}^{-1}$  de CP, causou efeitos negativos na reprodutibilidade do organismo até sua terceira geração.

#### 5.4.2 Fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

A partir dos testes de fitotoxicidade realizados com sementes de *Lactuca sativa* e amostras de Lorsban<sup>®</sup>, pré e pós processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, obteve-se a medida do comprimento das radículas e o total de sementes germinadas. Após o período de exposição de 120 horas, foram possíveis os cálculos do coeficiente de variação (CV), a média de crescimento das radículas (CRad) e seus respectivos desvios padrão, índice de germinação (IG) e índice de crescimento relativo (ICR).

No teste de controle positivo com glifosato (6%), não houve germinação das sementes, como era esperado, devido a função herbicida do mesmo.

Nas amostras do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 6), observa-se que duas delas apresentaram inibição da radícula, como pode ser visto pelo índice de crescimento relativo de 0,7. Este resultado indica uma geração de subprodutos de degradação mais tóxicos que o próprio agrotóxico em questão, corroborando com dados da literatura (HEBERLE et al., 2019; UTZIG et al., 2019).

**Tabela 6 - Resultado dos testes de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* e amostras de Lorsban® após processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Processo / Amostra		CRad (cm) ± DP	CV (%)	IG (%)	ICR	Efeito
Controle negativo		2,8 ± 0,8 <sup>a*</sup>	29,3	na	na	na
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0 min	2,7 ± 0,6 <sup>a*</sup>	20,7	100	1,0	NS
	30 min	2,5 ± 0,8 <sup>a*</sup>	31,8	100	0,9	NS
	60 min	2,0 ± 0,6 <sup>b*</sup>	30,2	100	0,7	I
	90 min	2,4 ± 0,7 <sup>a*</sup>	32,4	100	0,9	NS
	120 min	2,2 ± 0,9 <sup>a*</sup>	43,1	100	0,8	NS
	240 min	2,1 ± 0,5 <sup>b*</sup>	26,0	100	0,7	I
	360 min	2,5 ± 0,6 <sup>a*</sup>	26,0	100	0,9	NS
	480 min	2,2 ± 0,6 <sup>a*</sup>	30,4	100	0,9	NS

**Nota:** CV: coeficiente de variação; CRad: média do comprimento da radícula; DP: desvio padrão; IG: índice de germinação; ICR: índice de crescimento relativo; na: não aplicável; NS: não significativo; I: inibição; <sup>a,b</sup>: letras diferentes, amostras consideradas significativamente diferentes (comparação entre amostra e controle). \*: p<0,05. Fonte: Autoria própria.

Nas amostras pós fotólise UVC (Tabela 7), nenhuma delas teve o índice de germinação afetado, bem como o índice de crescimento relativo abaixo de 0,8, indicando que as amostras não apresentaram toxicidade para este organismo.

**Tabela 7 - Resultado dos testes de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* e amostras de Lorsban® após tratamentos por fotólise UVC.**

Processo / Amostra		CRad (cm) ± DP	CV (%)	IG (%)	ICR	Efeito
Controle negativo		2,6 ± 0,7 <sup>a*</sup>	26,5	na	na	na
Fotólise UVC	0 min	2,5 ± 0,8 <sup>a*</sup>	33,8	100	0,9	NS
	30 min	2,2 ± 0,8 <sup>a*</sup>	37,6	100	0,8	NS
	60 min	2,2 ± 0,7 <sup>a*</sup>	29,6	100	0,9	NS
	90 min	2,2 ± 0,6 <sup>a*</sup>	28,6	100	0,8	NS
	120 min	2,4 ± 0,6 <sup>a*</sup>	27,8	100	0,8	NS
	240 min	2,0 ± 0,5 <sup>a*</sup>	27,3	100	0,9	NS
	360 min	2,1 ± 0,5 <sup>a*</sup>	25,2	100	0,9	NS
	480 min	2,1 ± 0,5 <sup>a*</sup>	23,0	100	0,9	NS

**Nota:** CV: coeficiente de variação; CRad: média do comprimento da radícula; DP: desvio padrão; IG: índice de germinação; ICR: índice de crescimento relativo; na: não aplicável; NS: não significativo; I: inibição; <sup>a,b</sup>: letras diferentes, amostras consideradas significativamente diferentes (comparação entre amostra e controle). \*: p<0,05. Fonte: Autoria própria.

Em relação ao índice de germinação, em ambos os processos, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras e o controle negativo.

Coincidentemente, para os tempos aonde houve inibição no crescimento das radículas, 60 e 240 minutos do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também foi observada cromatograficamente a presença de CPO entre os subprodutos, porém, o CPO também foi observado nas amostras de fotólise UVC, nos tempos de 240 e 480 minutos, não sendo observada inibição no crescimento das radículas, impossibilitando relacionar o efeito da fitotoxicidade relacionada a presença deste subproduto.

Utzig et al. (2019) avaliaram a fitotoxicidade do CP (padrão analítico) não tratado, em presença de acetonitrila (0,2%), e não observou efeitos fitotóxicos em concentrações de CP variando de 0,02 mg L<sup>-1</sup> - 200 mg L<sup>-1</sup>, indicando que nestas condições o CP não apresenta efeito fitotóxico para sementes de *L. sativa*. Entretanto, em seus estudos de degradação, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, foram observados resultados que indicaram efeito inibitório após 180 minutos de tratamento.

A avaliação da influência da acetonitrila com uso da fotólise UVC, indicou que os subprodutos gerados a partir do tratamento do solvente (branco) por 180 minutos, não geraram efeito sobre a fitotoxicidade. No entanto, para o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, testado nas mesmas condições da fotólise, foi observado efeito inibitório nas sementes, indicando influência do solvente no processo (UTZIG, 2016), e também de toxicidade, conforme já citado, para as análises com *D. magna* (BRAGA, 2017).

Estudos de fitotoxicidade em *L. sativa*, dos solventes acetona, acetonitrila e metanol (0,2% em solução aquosa), nas condições pré e pós 180 minutos de tratamento com radiação abrandada, incluindo fotólise UVC e o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também foram realizados por Lima (2017), demonstrando que antes do tratamento, somente o metanol apresentava efeito fitotóxico sobre as sementes. Entretanto, após tratamento por 180 minutos, os subprodutos do tratamento do metanol e da acetonitrila apresentaram efeito inibitório, quando tratados por fotólise UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contrariando o resultado observado por Utzig (2016) para a acetonitrila, e corroborando com a hipótese da influência do solvente nos processos de tratamento.

Lima (2017) realizou o mesmo teste de fitotoxicidade após degradação do Lorsban® (200 µg L<sup>-1</sup>) por fotólise UVC, processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e foto-Fenton (com a lâmpada abrandada a 10 cm da borda do reator), e não observou toxicidade nas amostras mesmo após 180 minutos de cada tratamento.

Ponderando os resultados deste estudo, onde foram observados efeitos fitotóxicos para as sementes de *Lactuca sativa*, pode-se inferir que a toxicidade destas amostras é decorrente da presença de subprodutos, gerados no decorrer do processo de tratamento.

#### 5.4.3 Atividade larvicida em *Aedes aegypti*

Os resultados dos testes realizados com larvas de *Aedes aegypti* e amostras de Lorsban<sup>®</sup>, pré e pós processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC (Tabelas 8 e 9, respectivamente), estão expressos pela média de organismos imóveis (MOI) e pela porcentagem de imobilidade dos organismos.

No tempo 0 minuto (amostra não tratada), de ambos os processos, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, observou-se imobilidade em 100% das larvas, resultado que corrobora a ação inseticida do composto Lorsban<sup>®</sup> (organofosforado indicado para o controle da dengue). Este comportamento tóxico pode ser explicado devido a estes organismos possuírem a enzima acetilcolinesterase, que por sua vez é o principal alvo do mecanismo de ação tóxica do CP.

Nas amostras pós processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 8), observou-se uma queda da toxicidade nos primeiros 30 minutos de degradação, não sendo observados efeitos tóxicos nos tempos de 60, 90, 120 e 480 minutos, porém, nos tempos de 240 e 360 minutos foram observados efeitos tóxicos, demonstrando a possibilidade de formação de subprodutos de elevada toxicidade ao longo das degradações.

Em relação aos valores de CE<sub>50</sub> do CP e do Lorsban<sup>®</sup>, para larvas de *Aedes aegypti*, estes foram determinados por Utzig (2016) e Lima (2017), sendo 0,84 µg L<sup>-1</sup> e 2,24 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na análise cromatográfica da amostra tratada por 30 minutos foi observada uma concentração residual de CP de 3,51 µg L<sup>-1</sup>. Diante deste valor, e dos valores de CE<sub>50</sub> para CP e Lorsban<sup>®</sup>, a toxicidade observada nesta amostra pode ser atribuída a concentração residual de CP, o qual encontra-se acima da CE<sub>50</sub> para larvas de *Aedes aegypti*, bem como pode ser atribuída também à formação de subprodutos do tratamento.

**Tabela 8 - Resultado dos testes de atividade larvicida com *Aedes aegypti* e amostras de Lorsban® após processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Processo / Amostra		MOI	Imobilidade (%)	DPR	CV (%)
Controle negativo		0	0	0	0
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0 min	20	100	0	0
	30 min	15,25	76,25	2,50	3,28
	60 min	0	0	0	0
	90 min	0	0	0	0
	120 min	0	0	0	0
	240 min	8,50	42,50	9,57	22,53
	360 min	14,50	71,25	4,79	6,71
	480 min	0	0	0	0

**Nota:** MOI: média de organismos imóveis (n=4); DPR: desvio padrão relativo; CV: coeficiente de variação. **Fonte:** Autoria própria.

Já nas amostras de 60, 90 e 120 minutos, não foi observada toxicidade, coincidindo com valores de CP abaixo de 0,02 µg L<sup>-1</sup> (abaixo da CE<sub>50</sub> do CP). Deste modo, a ausência de toxicidade nos tempos supracitados, infere à ausência de subprodutos tóxicos para este organismo.

Em relação aos subprodutos, nos tempos de 60 e 240 min, foram observados picos cromatográficos atribuídos ao CPO, porém, em 60 minutos não foi observada toxicidade para este organismo, enquanto em 240 minutos foi observada toxicidade. Estes dados contrariam relatos de maior toxicidade do CPO frente ao CP (JOHN; SHAIKE, 2015). Em ambos os tempos analisados a área do pico observado para o CPO é similar, descartando efeito de concentração deste analito. Neste caso, sugere-se que o efeito tóxico esteja relacionado a outros subprodutos formados a partir dos componentes do Lorsban®. Isto pode ser corroborado na amostra de 360 minutos, onde não há CPO e a toxicidade é mais elevada quando comparada ao tempo de 240 minutos de tratamento.

Em 480 minutos de tratamento, não foi mais observada toxicidade da amostra. Neste caso, sugere-se que os próprios subprodutos responsáveis por apresentar toxicidade ao meio em 360 minutos, passaram por processo de degradação contínua, considerando-se que eles foram degradados.

Em relação as amostras pós fotólise UVC (Tabela 9), foi observado efeito tóxico na amostra de 30 minutos, onde a concentração residual de CP era de 1,65 µg L<sup>-1</sup>,

também superior a  $CE_{50}$  do CP. Sendo assim, pode-se supor, que a toxicidade observada nesta amostra foi causada, a princípio, pelo princípio ativo (CP), mas pode também ser resultado da formação de subprodutos no meio.

Nos tempos superiores a 30 minutos, não foram observados efeitos tóxicos para as demais amostras, supondo-se que não houve formação de subprodutos tóxicos para este organismo.

**Tabela 9 - Resultado dos testes de atividade larvicida com *Aedes aegypti* e amostras de Lorsban® após tratamentos por fotólise UVC.**

Processo / Amostra		MOI	Imobilidade (%)	DPR	CV (%)
Controle negativo		0	0	0	0
Fotólise UVC	0 min	20	100	0	0
	30 min	16,75	83,75	6,29	7,51
	60 min	0	0	0	0
	90 min	0	0	0	0
	120 min	0	0	0	0
	240 min	0	0	0	0
	360 min	0	0	0	0
	480 min	0	0	0	0

**Nota: MOI: média de organismos imóveis (n=4); DPR: desvio padrão relativo; CV: coeficiente de variação. Fonte: Autoria própria.**

Utzig (2016) avaliou a influência do solvente (0,2% de acetonitrila em água de osmose), na imobilidade das larvas de *A. aegypti*, verificando que a solução não apresentou efeitos de toxicidade para as larvas. Nesta condição, a  $CE_{50}$  em presença de CP foi de  $0,84 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para as soluções contendo 0,2% de acetonitrila em água, tratadas por fotólise UVC, após 180 minutos, com radiação abrandada, não foi observado efeito tóxico. Em relação às amostras tratadas por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, após os mesmos 180 minutos, foi observada toxicidade próxima a 100%. Quando adicionado o CP em concentração de  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , os resultados foram iguais aos obtidos sem a presença do composto, desta forma, não foi possível afirmar se a toxicidade observada era devido a presença ou não de CP.

Em relação ao Lorsban®, Lima (2017) observou uma  $CE_{50}$  para as larvas do *Aedes aegypti* de  $2,24 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estes resultados mostram que a presença de compostos (solventes) da formulação do produto comercial tornam ele menos tóxico,

sinalizando um efeito antagonista em relação à toxicidade, quando comparado com a toxicidade dos mesmos compostos por *D. magna*.

Considerando ainda o tratamento do Lorsban<sup>®</sup>, avaliado por Lima (2017), usando radiação abrandada, foi observado, após 180 minutos, pequenas reduções nas taxas de imobilidade em *Aedes aegypti*. A amostra submetida a fotólise UVC apresentou toxicidade de 73,3%, enquanto a amostra submetida ao processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou 83,0%.

No presente trabalho, devido a maior eficiência do tratamento, com a lâmpada mergulhada na solução, houve uma diminuição mais rápida da toxicidade, quando comparado com os resultados de Lima (2017).

Cabe ressaltar que testes com larvas de *Aedes aegypti* não são utilizadas por outros grupos de pesquisa, para a análise de subprodutos de tratamento por processos avançados de oxidação, sendo pioneiro os estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa para esse tipo de análise, neste caso, ainda não se dispõe de artigos na literatura para maiores discussões a respeito dos resultados.

#### 5.4.4 Considerações sobre os resultados cromatográficos e bioensaios

Para facilitar a observação conjunta dos resultados, os dados das análises cromatográficas e dos testes de ecotoxicidade, de ambos os processos de tratamento, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, estão compilados na Tabela 10.

Analisando a toxicidade das amostras no tempo zero (sem degradação), para *D. magna* e *A. aegypti*, pode-se explicar este comportamento tóxico devido à estes organismos serem animais, e possuírem a enzima acetilcolinesterase, principal alvo do mecanismo de ação tóxica do CP. Desta forma, a *L. sativa* (alface), por ser um vegetal, não tem a enzima acetilcolinesterase, e talvez por isso não tenha apresentado toxicidade inicial.

Dito isto, nas amostras de 60 e 240 minutos, do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a *L. sativa* apresentou resultados tóxicos, visto a inibição no crescimento das radículas. Como este organismo não havia apresentado resposta de toxicidade ao Lorsban<sup>®</sup>, sem tratamento, pode-se desta forma concluir que houve formação de subprodutos mais tóxicos do que o composto inicial. Entretanto, na amostra de 60 minutos, não houve

toxicidade para o *A. aegypti*, desta forma, fica evidente a necessidade de bioensaios com mais de um organismo alvo, para que os resultados não sejam tendenciosos.

**Tabela 10 - Resultados compilados dos tratamentos realizados com amostras de Lorsban®.**

Processo		0'	30'	60'	90'	120'	240'	360'	480'
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>A. aegypti</i>	100%	76,25%	0	0	0	42,5%	71,25%	0
	<i>L. sativa</i>	NS	NS	I	NS	NS	I	NS	NS
	<i>D. magna</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	63,33%
	CP (µg L <sup>-1</sup> )	200	3,51	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	*CPO	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
Fotólise UVC	<i>A. aegypti</i>	100%	83,75%	0	0	0	0	0	0
	<i>L. sativa</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	<i>D. magna</i>	100%	100%	100%	100%	30%	100%	40%	100%
	CP (µg L <sup>-1</sup> )	200	1,65	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	*CPO	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim

**Nota:** LD: 0,02 µg L<sup>-1</sup>; \*CPO: presença de clorpirifós-oxon. Fonte: Autoria própria.

Para as demais amostras, de ambos os processos, de 60 minutos em diante, a concentração residual de CP foi observada cromatograficamente abaixo do limite de detecção do método (< 0,02 µg L<sup>-1</sup>), e mesmo assim foram observadas variações de toxicidade nos três organismos teste. Esta oscilação de toxicidade pode ser atribuída a subprodutos de degradação, do CP ou das demais substâncias presentes na formulação do próprio Lorsban®.

Perante os valores de CE<sub>50</sub> do CP (padrão analítico) e do Lorsban® (comercial), 0,84 µg L<sup>-1</sup> e 2,24 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente, nas larvas de *Aedes aegypti*, é possível inferir que o padrão analítico é mais tóxico que o composto comercial. Contudo, os valores de CE<sub>50</sub> também demonstram efeito contrário de toxicidade, quando comparado com os valores de CE<sub>50</sub> para *D. magna*, com CP (padrão analítico) e Lorsban® (comercial), 0,15 µg L<sup>-1</sup> e 1,4x10<sup>-4</sup> µg L<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo o composto comercial mais tóxico que o padrão analítico.

Visto os dados acima, não é possível afirmar que os solventes utilizados nas formulações do composto comercial potencializam a toxicidade, quando analisado em diferentes organismos-alvo, por isso, novamente, percebe-se a importância de utilizar organismos de diferentes níveis tróficos.

Analisando todos os resultados simultaneamente, e comparando os métodos de tratamento, não se pode delimitar o melhor processo. Mesmo ambos apresentando taxas de degradação muito eficientes, e pouco discrepantes, ainda apresentaram níveis de ecotoxicidade variáveis ao longo dos processos, não sendo possível distinguir, por exemplo, em qual processo de tratamento a ecotoxicidade seria removida primeiro e por completo, reforçando a importância do monitoramento cromatográfico dos efluentes tratados, aliado aos bioensaios.

## 6 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível verificar que ambos os processos de degradação, processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fotólise UVC, demonstraram-se eficientes para o tratamento do princípio ativo clorpirifós, com 98,24% e 99,18% de degradação, respectivamente, em 30 minutos de processo. Nas amostras de 60 minutos em diante, atingiram-se níveis superiores a 99,99% de degradação do CP, em ambos os tratamentos.

Outro ponto relevante do estudo, foi a visualização de vários subprodutos de degradação, sugerindo diferentes mecanismos de formação para cada processo, porém, alguns destes subprodutos foram igualmente formados após ambos os processos de tratamento, inferindo que as rotas de formação destes compostos são favorecidas, em presença de radiação UVC.

Contudo, observando as altas taxas de degradação do princípio ativo, e a formação de diversos subprodutos de degradação, também foi possível inferir a presença de compostos tóxicos a partir dos bioensaios, visto a toxicidade oscilante das amostras para os três organismos teste, em até 480 minutos de ambos os tratamentos.

Desta forma, os bioensaios demonstraram grande relevância para o estudo, tornando explícito que mesmo atingindo altas taxas de degradação do composto alvo, deve-se analisar os níveis traço do mesmo, e seus possíveis subprodutos de degradação, para diversos integrantes do ecossistema, fato este que na maioria das vezes é negligenciado.

A partir destes resultados, prova-se que os subprodutos formados em processos de degradação, podem ser responsáveis pelo aumento da toxicidade do efluente tratado, ou por gerar toxicidade para certos organismos, onde a princípio não havia. Portanto, os resultados dos testes ecotoxicológicos fornecem uma avaliação profunda, e mais consciente, sobre a eficiência e viabilidade dos tratamentos propostos, sendo difícil estabelecer um único método de tratamento para amostras complexas, como é o caso dos agrotóxicos comerciais.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Seria interessante avaliar as amostras geradas através de técnica cromatográfica com detectores de massa, para uma melhor compreensão dos dados obtidos, tornando possível a comparação dos resultados com dados da literatura.

Também seria muito enriquecedor para a pesquisa, realizar os mesmos processos de degradação, apenas com os compostos da formulação do agrotóxico comercial, sem o ingrediente ativo, para avaliar a real toxicidade destes, como é o caso dos solventes orgânicos de laboratório. No entanto, sabe-se da dificuldade de obtenção desta amostra.

Devido a hipótese do TCP ter sido gerado, mas não ter sido extraído eficientemente pelo método de extração líquido-líquido, utilizado neste trabalho, sugere-se a realização de uma avaliação da fase aquosa.

Para interpretação de alguns resultados encontrados neste trabalho, a quantificação do CPO, bem como estudos de sua toxicidade para os organismos testados, poderiam ajudar a elucidar alguns destes resultados.

Ainda, seriam interessantes estudos envolvendo outros processos avançados de oxidação, realização de outros bioensaios com outros organismos teste e/ou ensaios crônicos, ou então adição de outros agrotóxicos comerciais nos processos de degradação, para avaliar possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas destes compostos quando tratados em conjunto.

## REFERÊNCIAS

ABDESSALEM, A. K.; BELLAKHAL, N.; OTURAN, N.; DACHRAOUI, M.; OTURAN, M. A. Treatment of a mixture of three pesticides by photo- and electro-Fenton processes. **Desalination**, v. 250, n. 1, p. 450–455, 2010.

AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; OLIVEIRA DAVID, J. A. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 366–372, 2016.

ALALM, M. G.; TAWFIK, A.; OOKAWARA, S. Combined solar advanced oxidation and PAC adsorption for removal of pesticides from industrial wastewater. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 6, n. 3, p. 800–809, 2015.

AMALRAJ, A.; PIUS, A. Photocatalytic degradation of monocrotophos and chlorpyrifos in aqueous solution using TiO<sub>2</sub> under UV radiation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 7, p. 94–101, 2015.

AMÉRICO, J. H. P.; MANOEL, L. O.; TORRES, N. H.; FERREIRA, L. F. R. O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 8, n. 13, p. 101–115, 2015.

AMIRI, H.; NABIZADEH, R.; SILVA MARTINEZ, S.; JAMALEDDIN SHAHTAHERI, S.; YAGHMAEIAN, K.; BADIEI, A.; NAZMARA, S.; NADDAFI, K. Response surface methodology modeling to improve degradation of chlorpyrifos in agriculture runoff using TiO<sub>2</sub> solar photocatalytic in a raceway pond reactor. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 919–925, 2018.

ANWAR, S.; LIAQUAT, F.; KHAN, Q.; KHALID, Z.; IQBAL, S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 400–405, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 12713** - Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.

AUTIN, O.; HART, J.; JARVIS, P.; MACADAN, J.; PARSONS, S. A.; JEFFERSON, B. The impact of background organic matter and alkalinity on the degradation of the pesticide metaldehyde by two advanced oxidation processes: UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>. **Water Research**, v. 47, n. 6, p. 2041–2049, 2013.

AZEVEDO, J. C. R.; MOURA, E. R. R.; SANTOS, M. M. Determinação de pesticidas na água e sedimento do Rio Piquiri. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 651–671, 2016.

BABUPONNUSAMI, A.; MUTHUKUMAR, K. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 557–572, 2014.

BAR, A.; ANDREW, J. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* larvae. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 2013.

BARBOSA, B. C. A. **Micodegradação de metil paration e atrazina em matriz aquosa sintética utilizando *Aspergillus niger* AN 400**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

BENSALAH, N.; CHAIR, K.; BEDOUI, A. Efficient degradation of tannic acid in water by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. **Sustainable Environment Research**, p. 1–11, 2017.

BERBERIDOU, C.; KITSIOU, V.; LAMBROPOULOU, D. A.; ANTONIADIS, A.; NTONOU, E.; ZALIDIS, G. C.; POULIOS, I. Evaluation of an alternative method for wastewater treatment containing pesticides using solar photocatalytic oxidation and constructed wetlands. **Journal of Environmental Management**, v. 195, p. 133–139, 2017.

BERTON, S. M. H. **Estudo da toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos utilizando *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BOCZKAJ, G.; FERNANDES, A. Wastewater treatment by means of advanced oxidation processes at basic pH conditions: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 320, p. 608–633, 2017.

BONIFACIO, A. F.; BALLESTEROS, M. L.; BONANSEA, R. I.; FILIPPI, I.; AMÉ, M. V.; HUED, A. C. Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. **Chemosphere**, v. 188, p. 486–493, 2017.

BORRÁS, E.; RÓDENAS, M.; VÁZQUEZ, M.; VERA, T.; MUÑOZ, A. Particulate and gas-phase products from the atmospheric degradation of chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon. **Atmospheric Environment**, v. 123, p. 112–120, 2015.

BRANDHUBER, P. J.; KORSHIN, G. Methods for the detection of residual concentrations of hydrogen peroxide in advanced oxidation processes. **WaterReuse Foundation**, Alexandria, VA, 2009.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRASIL. **Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Brasil, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: SVS, 2011.

BRITO, N. N.; SILVA, V. B. M. Processo oxidativo avançado e sua aplicação ambiental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v. 3, p. 36–47, 2012.

CÁCERES, T.; HE, W.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. **Water Research**, v. 41, p. 4497–4503, 2007.

CCANCCAPA, A.; MASIÁ, A.; NAVARRO-ORTEGA, A.; PICÓ, Y.; BARCELÓ, D. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 414–424, 2016.

CHENNA, M.; MESSAOUDI, K.; DROUCHE, N.; LOUNICI, H. Study and modeling of the organophosphorus compound degradation by photolysis of hydrogen peroxide in aqueous media by using experimental response surface design. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2015.

CHIARELLO, M.; GRAEFF, R.; MINETTO, L.; CEMIN, G.; SCHNEIDER, V. E.; MOURA, S.; CIARELLO, M.; GRAEFF, R. N. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e a ocupação do solo. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 158–165, 2016.

CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; RODRIGUEZ, A.; GARCIA-CALVO, E. Pesticide chemical oxidation: State-of-the-art. **Water Research**, v. 34, n. 2, p. 366–377, 2000.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.). **The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure**. Cambridge University Press, 1960.

COLLOTTA, M.; BERTAZZI, P. A.; BOLLATI, V. Epigenetics and pesticides. **Toxicology**, v. 307, p. 35–41, 2013.

CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL. **Os impactos dos agrotóxicos na segurança alimentar e nutricional**: Contribuições do CONSEA. 2012. 28 p.

CUPERTINI, P. M. **Avaliação da toxicidade aguda do fungicida tebuconazole utilizando o organismo teste *Daphnia magna***. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária) - Universidade Federal da Fronteira do Sul, Rio Grande do Sul, 2017.

DE LA CRUZ, N.; ESQUIUS, L.; GRANDJEAN, D.; MARGNET, A.; TUNGLER, A.; DE ALENCASTRO, L. F.; PULGARÍN, C. Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 47, n. 15, p. 5836–5845, 2013.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296–1301, 2014.

DEMETRIO, P. M.; BONETTO, C.; RONCO, A. E. The effect of cypermethrin, chlorpyrifos, and glyphosate active ingredients and formulations on *Daphnia magna* (Straus). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 268–273, 2014.

DI GUARDO, A.; FINIZIO, A. A new methodology to identify surface water bodies at risk by using pesticide monitoring data: The glyphosate case study in Lombardy Region (Italy). **Science of the Total Environment**, v. 610–611, p. 421–429, 2018.

DIAS, M. A. **Desenvolvimento de método cromatográfico para determinação de pesticidas em fase gasosa utilizando amostradores de baixo volume**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

DÍAZ-GARDUÑO, B.; RUEDA-MÁRQUEZ, J. J.; MANZANO, M. A.; GARRIDO-PÉREZ, C.; MARTÍN-DÍAZ, M. L. Are combined AOPs effective for toxicity reduction in receiving marine environment? Suitability of battery of bioassays for wastewater treatment plant (WWTP) effluent as an ecotoxicological assessment. **Marine Environmental Research**, v. 114, p. 1–11, 2016.

DOSSIÊ ABRASCO: **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

DUTTA, A.; CHAKRABORTY, I.; SARKAR, D.; CHAKRABARTI, S. Sunlight-assisted photo-Fenton degradation of pesticide in wastewater: Ecotoxicological impact on *Nostoc* sp. algae. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 12, p. 1–13, 2015.

FATMA, F.; VERMA, S.; KAMAL, A.; SRIVASTAVA, A. Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 1, p. 115–123, 2018.

FEMIA, J.; MARIANI, M.; ZALAZAR, C.; TISCORNIA, I. Photodegradation of chlorpyrifos in water by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment: Toxicity evaluation. **Water Science and Technology**, v. 68, n. 10, p. 2279–2286, 2013.

FERRARIO, C.; PAROLINI, M.; FELICE, B.; VILLA, S.; FINIZIO, A. Linking sub-individual and supra-individual effects in *Daphnia magna* exposed to sub-lethal concentration of chlorpyrifos. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 411–418, 2018.

FUNAI, D. H.; DIDIER, F.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S.; MARCO, P.; MACHULEK, A. Photo-Fenton treatment of valproate under UVC, UVA and simulated solar radiation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 537–549, 2017.

GABARDO, R. P. **Aplicação do método QuEChERS no preparo de amostras de águas superficiais para determinação de atrazina, desisopropilatrazina (DIA), desetilatrazina (DEA) e carbendazim por LC-DAD.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

GARCIA, J. C.; SIMIONATO, J. I.; ALMEIDA, V. C.; SCHNEIDER, M. V.; SOUZA, N. Evolutive follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1589–1597, 2009.

GIANNAKIS, S. A review of the concepts, recent advances and niche applications of the (photo) Fenton process, beyond water/wastewater treatment: Surface functionalization, biomass treatment, combatting cancer and other medical uses. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 248, p. 309–319, 2019.

GOMES JUNIOR, O. **Degradação fotocatalítica do inseticida fipronil: otimização multivariada, identificação dos produtos de degradação e avaliação da toxicidade**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

GOZZI, F.; MACHULEK, A.; FERREIRA, V. S.; OSUGI, M. E.; SANTOS, A. P. F.; NOGUEIRA, J. A.; DANTAS, R. F.; ESPLUGAS, S.; DE OLIVEIRA, S. C. Investigation of chlorimuron-ethyl degradation by Fenton, photo-Fenton and ozonation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 210, p. 444–450, 2012.

GOZZI, F.; SIRÉS, I.; THIAM, A.; DE OLIVEIRA, S. C.; MACHULEK JUNIOR, A.; BRILLAS, E. Treatment of single and mixed pesticide formulations by solar photoelectro-Fenton using a flow plant. **Chemical Engineering Journal**, v. 310, p. 503–513, 2017.

G1. **Estudo encontra resíduos de agrotóxicos na água de 22 municípios de SC**. Disponível em: < <https://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2019/03/22/estudo-encontra-residuos-de-agrotoxicos-na-agua-de-22-municipios-de-sc.ghtml>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

HEBERLE, A. N. A.; ALVES, M. E. P.; SILVA, S. W.; KLAUCK, C. R.; RODRIGUES, M. A. S.; BERNARDES, A. M. Phytotoxicity and genotoxicity evaluation of 2,4,6-tribromophenol solution treated by UV-based oxidation processes. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 354–361, 2019.

HENTATI, O.; ABRANTES, N.; CAETANO, A. L.; BOUGUERRA, S.; GONÇALVES, F.; RÖMBKE, J.; PEREIRA, R. Phosphogypsum as a soil fertilizer: Ecotoxicity of amended soil and elutriates to bacteria, invertebrates, algae and plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 294, p. 80–89, 2015.

HUTCHINSON, T. H.; SHILLABEER, N.; WINTER, M. J.; PICKFORD, D. B. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 69–92, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Consumo de agrotóxicos e afins (2000 - 2017)**. Disponível em:< [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/Grafico-Consumo\\_agrotoxicos\\_2000-2017.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/Grafico-Consumo_agrotoxicos_2000-2017.pdf)>. Acesso em: 21 mar. 2019.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná**. Curitiba: IPARDES, 2017. 142 p.

ISMAIL, M.; KHAN, H. M.; SAYED, M.; COOPER, W. J. Advanced oxidation for the treatment of chlorpyrifos in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 93, n. 4, p. 645–651, 2013.

JASIM, S. Y.; SATHTHASIVAM, J. Advanced oxidation processes to remove cyanotoxins in water. **Desalination**, v. 406, p. 83–87, 2016.

JEFFERSON, B.; JARVIS, P.; BHAGIANATHAN, G. K.; SMITH, H.; AUTIN, O.; GOSLAN, E. H. Effect of elevated UV dose and alkalinity on metaldehyde removal and THM formation with UV/TiO<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Chemical Engineering Journal**, v. 288, p. 359–367, 2016.

JOHN, E. M.; SHAIKE, J. M. Chlorpyrifos: pollution and remediation. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 269–291, 2015.

KIKUCHI, M.; SASAKI, Y.; WAKABAYASHI, M. Screening of organophosphate insecticide pollution in water by using *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 239–245, 2000.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525–535, 2017.

KLAMERTH, N.; MALATO, S.; AGUËRA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Photo-Fenton and modified photo-Fenton at neutral pH for the treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluents: A comparison. **Water Research**, v. 47, n. 2, p. 833–840, 2013.

LE COADOU, L.; LE MÉNACH, K.; LABADIE, P.; DÉVIER, M. H.; PARDON, P.; AUGAGNEUR, S.; BUDZINSKI, H. Quality survey of natural mineral water and spring water sold in France: Monitoring of hormones, pharmaceuticals, pesticides, perfluoroalkyl substances, phthalates, and alkylphenols at the ultra-trace level. **Science of the Total Environment**, v. 603–604, p. 651–662, 2017.

LIMA, R. M. **Avaliação da radiação UVC, processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e foto-fenton na degradação do agrotóxico clorpirifós com acompanhamento da ecotoxicidade**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

LIMA, M. J.; SILVA, C. G.; SILVA, A. M. T.; LOPES, J. C. B.; DIAS, M. M.; FARIA, J. L. Homogeneous and heterogeneous photo-Fenton degradation of antibiotics using

an innovative static mixer photoreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 310, p. 342–351, 2017.

LIN, A. Y. C.; LIN, Y. C.; LEE, W. N. Prevalence and sunlight photolysis of controlled and chemotherapeutic drugs in aqueous environments. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 170–181, 2014.

LING, Y.; HAN, W.; WEI, Y.; FENG, Z.; LI, S.; MIN LI, Y.; YONG NING, W.; XIAO GANG, C. The effects of washing and cooking on chlorpyrifos and its toxic metabolites in vegetables. **Food Control**, v. 22, n. 1, p. 54–58, 2011.

LIZ, M. V. **Estudo da potencialidade da fotocatalise heterogênea (TiO<sub>2</sub> e ZnO) e dos processos Fenton para remediação de águas contaminadas pelos estrogênios estrona, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol**. 2013. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LIZANO-FALLAS, V.; MASÍS-MORA, M.; ESPINOZA-VILLALOBOS, D.; LIZANO-BRENES, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Removal of pesticides and ecotoxicological changes during the simultaneous treatment of triazines and chlorpyrifos in biomixtures. **Chemosphere**, v. 182, p. 106–113, 2017.

LOPES DIAS, I. C.; COSTA, H. D.; FIRMO, W. C. A.; MENDES, H. B. R.; NUNES, G. S. Prospecção científica e tecnológica sobre métodos de detecção de agrotóxicos em amostras de água. **Revista GEINTEC**, v. 6, n. 1, p. 2874–2884, 2016.

LOPEZ-ALVAREZ, B.; VILLEGAS-GUZMAN, P.; PEÑUELA, G. A.; TORRES-PALMA, R. A. Degradation of a toxic mixture of the pesticides carbofuran and iprodione by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Evaluation of parameters and implications of the degradation pathways on the synergistic effects. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 227, n. 6, 2016.

LÓPEZ, N.; PLAZA, S.; AFKHAMI, A.; MARCO, P.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S. Treatment of diphenhydramine with different AOPs including photo-Fenton at circumneutral pH. **Chemical Engineering Journal**, v. 318, p. 112–120, 2017.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F. I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MACHADO, K. C.; GRASSI, M. T.; VIDAL, C.; PESCARA, I. C.; JARDIM, W. F.; FERNANDES, A. N.; SODRÉ, F. F.; ALMEIDA, F. V.; SANTANA, J. S.; CANELA, M. C.; NUNES, C. R. O.; BICHINHO, K. M.; SEVERO, F. J. R. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MARIGOUDAR, S. R.; NAGARJUNA, A.; KARTHIKEYAN, P.; MOHAN, D.; SHARMA, K. V. Comparative toxicity of chlorpyrifos: Sublethal effects on enzyme activities and histopathology of *Mugil cephalus* and *Chanos chanos*. **Chemosphere**, v. 211, p. 89–101, 2018.

MARTINEZ, S.; DELGADO, M.; JARVIS, P. Removal of herbicide mecoprop from surface water using Advanced Oxidation Processes (AOPs). **International Journal of Environmental Research**, v. 10, n. 2, p. 291–296, 2016.

MATIAS, V. A.; TAMANAHA, M. S. Monitoramento dos agrotóxicos quinclorac e carbofuran no Rio Camboriú, município de Camboriú, Santa Catarina. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 18, n. 1, p. 30–45, 2016.

MCKNIGHT, U. S.; RASMUSSEN, J. J.; KRONVANG, B.; BINNING, P. J.; BJERG, P. L. Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. **Environmental Pollution**, v. 200, p. 64–76, 2015.

MIKLOS, D. B.; REMY, C.; JEKEL, M.; LINDEN, K. G.; HÜBNER, U. Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment - A critical review. **Water Research**, v. 139, p. 118–131, 2018.

MORALES, G. C.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P.; RONCO, A.; SOBRERO, C.; ROSSINI, G. B.; FEOLA, G.; FORGET, G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México, **IMTA**, 2004.

MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 576–597, 2017.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157–177, 2013.

MURILLO, R.; SARASA, J.; LANAO, M.; OVELLEIRO, J. L. Degradation of chlorpyrifos in water by advanced oxidation processes. **Water Science & Technology: Water Supply**, v. 10, p. 1–6, 2010.

MUTURI, E. J., DONTU, R. K., FIELDS, C. J., MOISE, I. K., KIM, C.-H., Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. **Scientific Reports**, p. 1–10, 2017.

NAKAMURA, E. **Avaliação das concentrações de pesticidas organoclorados em águas superficiais pela otimização da técnica USAEME**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

NAVARRO, P.; GABALDÓN, J. A.; GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Degradation of an azo dye by a fast and innovative pulsed light/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation process. **Dyes and Pigments**, v. 136, p. 887–892, 2017.

NAYAK, S.; MUNIZ, J.; SALES, C. M.; TIKEKAR, R. V. Fructose as a novel photosensitizer: Characterization of reactive oxygen species and an application in degradation of diuron and chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 144, p. 1690–1697, 2016.

OLAK-KUCHARCZYK, M.; LEDAKOWICZ, S. Advanced oxidation of preservative agents in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVC system - Kinetics study, transformation products and toxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 333, p. 348–357, 2017.

OLIVEIRA, L. L. D.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; ROCHA, O.; NUNES, B. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 123–131, 2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Ligne directrice de L'OECD pour les essais de produits chimiques**. 2012. Disponível em: <[https://read.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-211-daphnia-magna-essai-de-reproduction\\_9789264185470-fr#page1](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-211-daphnia-magna-essai-de-reproduction_9789264185470-fr#page1)>. Acesso em: 13 mar. 2019.

PALMA, P.; KÖCK-SCHULMEYER, M.; ALVARENGA, P.; LEDO, L.; BARBOSA, I. R.; LÓPES DE ALDA, M.; BARCELÓ, D. Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal). **Science of the Total Environment**, v. 488–489, n. 1, p. 208–219, 2014.

PALMA, P.; PALMA, V. L.; MATOS, C.; FERNANDES, R. M.; BOHN, A.; SOARES, A. M. V. M.; BARBOSA, I. R. Assessment of the pesticides atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos for juvenoid-related endocrine activity using *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 76, n. 3, p. 335–340, 2009.

PARKER, A. M.; LESTER, Y.; SPENGLER, E. K.; VON GUNTEN, U.; LINDEN, K. G. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation for abatement of organophosphorous pesticides and the effects on various toxicity screening assays. **Chemosphere**, v. 182, p. 477–482, 2017.

PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS. **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. 2016.

PELIT, F. O.; PELIT, L.; ERTAŞ, H.; NIL ERTAŞ, F. Development of a gas chromatographic method for the determination of chlorpyrifos and its metabolite chlorpyrifos-oxon in wine matrix. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 904, p. 35–41, 2012.

PINTO, M. I.; SALGADO, R.; COTTRELL, B. A.; COOPER, W. J.; BURROWS, H. D.; VALE, C.; SONTAG, G.; NORONHA, J. P. Influence of dissolved organic matter on the photodegradation and volatilization kinetics of chlorpyrifos in coastal waters. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 310, p. 189–196, 2015.

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, 2017.

PUBCHEM. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

PUPO NOGUEIRA, R. F.; TROVÓ, A. G.; DA SILVA, M. R. A.; VILLA, R. D.; DE OLIVEIRA, M. C. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 400–408, 2007.

RAHIM POURAN, S.; ABDUL AZIZ, A. R.; WAN DAUD, W. M. A. Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 53–69, 2015.

RANGEL, C. D. F.; ROSA, A. C. S.; SARCINELLI, P. D. N. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. **Caderno Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 435–442, 2011.

REBECHI, D.; RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; GUILOSKI, I. C.; ASSIS, H. C. S.; NAVARRO-SILVA, M. A. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticarloi* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 3, p. 296–301, 2014.

REDDY, P. V. L.; KIM, K. H. A review of photochemical approaches for the treatment of a wide range of pesticides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 325–335, 2015.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 45, n. 15, p. 4311–4340, 2011.

RIZZO, L.; MALATO, S.; ANTAKYALI, D.; BERETSOU, V. G.; MAJA, B. Đ.; GERNJAK, W.; HEATH, E.; IVANCEV-TUMBAS, I.; KARAOLIA, P.; LADO, A. R.; MASCOLO, G.; MCARDELL, C. S.; SCHAAR, H.; SILVA, A. M. T.; FATTA-KASSINOS, D. Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 986–1008, 2019.

ROBLES-MOLINA, J.; VIDALES, M. J. M.; GARCÍA-REYES, J. F.; CAÑIZARES, P.; SÁEZ, C.; RODRIGO, M. A.; MOLINA-DÍAZ, A. Conductive-diamond electrochemical oxidation of chlorpyrifos in wastewater and identification of its main degradation products by LC-TOFMS. **Chemosphere**, v. 89, n. 10, p. 1169–1176, 2012.

ROUSIS, N. I.; BADE, R.; BIJLSMA, L.; ZUCCATO, E.; SANCHO, J. V.; HERNANDEZ, F.; CASTIGLIONI, S. Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy. **Environmental Research**, v. 156, p. 31–38, 2017.

SAINI, R.; KUMAR, P. Optimization of chlorpyrifos degradation by Fenton oxidation using CCD and ANFIS computing technique. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 3, p. 2952–2963, 2016.

SANTANA, C. M.; COSTA, A. R. D.; NUNES, R. M. P.; NUNES, N. M. F.; PERON, A. P.; MELO-CAVALCANTE, A. A. D. C.; FERREIRA, P. M. P. Exposição ocupacional de trabalhadores rurais a agrotóxicos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 301–307, 2016.

SHARMA, A.; AHMAD, J.; FLORA, S. J. S. Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products. **Environmental Research**, v. 167, p. 223–233, 2018.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J.; WU, C.; MacKILLOP, E. A.; LINDEN, K. G. Ultraviolet photolysis of chlorpyrifos: Developmental neurotoxicity modeled in PC12 cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 338–343, 2009.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Imta**, p. 55–67, 2004.

SOLÍS, R. R.; RIVAS, F. J.; MARTÍNEZ-PIERNAS, A.; AGÜERA, A. Ozonation, photocatalysis and photocatalytic ozonation of diuron: Intermediates identification. **Chemical Engineering Journal**, v. 292, p. 72–81, 2016.

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

SPARLING, D.; FELLERS, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. **Environmental Pollution**, v. 147, p. 535–539, 2006.

STARLING, M. C. V. M.; SOUZA, P. P.; LE PERSON, A.; AMORIM, C. C.; CRIQUET, J. Intensification of UV-C treatment to remove emerging contaminants by UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV-C/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>: Susceptibility to photolysis and investigation of acute toxicity UV-C. **Chemical Engineering Journal**, 2019. No prelo.

SUNIL PAUL, M. M.; ARAVIND, U. K.; PRAMOD, G.; ARAVINDAKUMAR, G. T. Oxidative degradation of fensulfothion by hydroxyl radical in aqueous medium. **Chemosphere**, v. 91, n. 3, p. 295–301, 2013.

TEDJOU, A. N.; KAMGANG, B.; YOUNGANG, A. P.; NJIOKOU, F.; WONDJI, C. S. Update on the geographical distribution and prevalence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), two major arbovirus vectors in Cameroon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 1–18, 2019.

TEODOSIU, C.; GILCA, A. F.; BARJOVEANU, G.; FIORE, S. Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental performances assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 197, p. 1210–1221, 2018.

THIND, P. S.; KUMARI, D.; JOHN, S. TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated UV photocatalysis of chlorpyrifos: Optimization of process parameters using response surface methodology. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, n. 6, p. 3602–3609, 2018.

TIWARI, M. K.; GUHA, S. Kinetics of biotransformation of chlorpyrifos in aqueous and soil slurry environments. **Water Research**, v. 51, p. 73–85, 2014.

TORRES, M. A.; LIZ, M. V.; MARTINS, L. R. R.; FREITAS, A. M. Does the photo-Fenton reaction work for microalgae control? A case study with. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 17, p. 517–521, 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Chlorpyrifos**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/chlorpyrifos>>. Acesso em: 07 mar. 2019.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticides industry sales and usage 2008–2012 market estimates**. 2017. Disponível em: <[https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf)>. Acesso em: 07 mar. 2019.

UTZIG, L. **Avaliação da fitotoxicidade, ecotoxicidade e genotoxicidade de clorpirifós após tratamento por radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

UTZIG, L. M.; LIMA, R. M.; GOMES, M. F.; RAMSDORF, W. A.; MARTINS, L. R. R.; LIZ, M. V. Ecotoxicity response of chlorpyrifos in *Aedes aegypti* larvae and *Lactuca sativa* seeds after UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UVC oxidation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 449–456, 2019.

VAGI, M. C.; PETSAS, A. S. Recent advances on the removal of priority organochlorine and organophosphorus biorecalcitrant pesticides defined by Directive 2013/39/EU from environmental matrices by using advanced oxidation processes: An overview (2007–2018). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2019. No prelo.

WANG, W.; WU, Q.; HUANG, N.; XU, Z.; LEE, M.; HU, H. Potential risks from UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation and UV photocatalysis: A review of toxic, assimilable, and sensory-unpleasant transformation products. **Water Research**, v. 141, p. 109–125, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Specifications and evaluations for public health pesticides chlorpyrifos**. 2009.

YADAV, I. C.; DEVI, N. L.; SYED, J. H.; CHENG, Z.; LI, J.; ZHANG, G.; JONES, K. C. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 123–137, 2015.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 182–186, 2012.

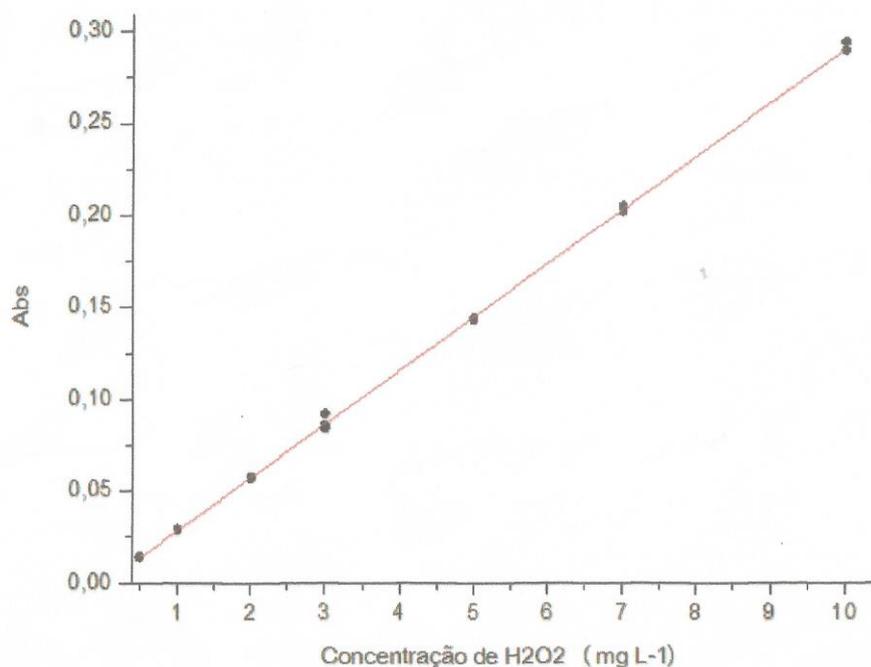
ZALIZNIAK, L.; NUGEGODA, D. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos in three successive generations of *Daphnia carinata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 207–214, 2005.

ZHU, X. D.; WANG, Y. J.; LIU, C.; QIN, W. X.; ZHOU, D. M. Kinetics, intermediates and acute toxicity of arsanilic acid photolysis. **Chemosphere**, v. 107, p. 274–281, 2014.

## ANEXO A – Curva analítica do peróxido de hidrogênio

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Cary 50 Bio, Varian), com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, na faixa de absorção de 395 nm.

Curva analítica do peróxido de hidrogênio (0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup>).



### Parâmetros de regressão da curva analítica do peróxido de hidrogênio.

Parâmetro	Valor
Faixa linear do método	0,5 - 10 mg L <sup>-1</sup>
Coefficiente linear	-0,000399
Desvio do coeficiente linear	0,000644
Coefficiente angular	0,02912
Desvio do coeficiente angular	0,000124
Coefficiente de correlação (r <sup>2</sup> )	0,99964
LQ <sub>calculado</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0,22
LQ <sub>adotado</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0,50

**ANEXO B – Ensaio de recuperação da extração líquido-líquido do Lorsban®**

Foram analisadas três diferentes concentrações de CP dentro da faixa linear do método (15 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Os valores de recuperação estão dentro dos limites aceitáveis, entre 70 e 125%, para amostras na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Ensaio de recuperação da extração líquido-líquido de soluções de Lorsban® analisadas por HPLC-DAD (eluição 90:10 de ACN:H<sub>2</sub>O, vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup> e monitoramento em 290 nm).**

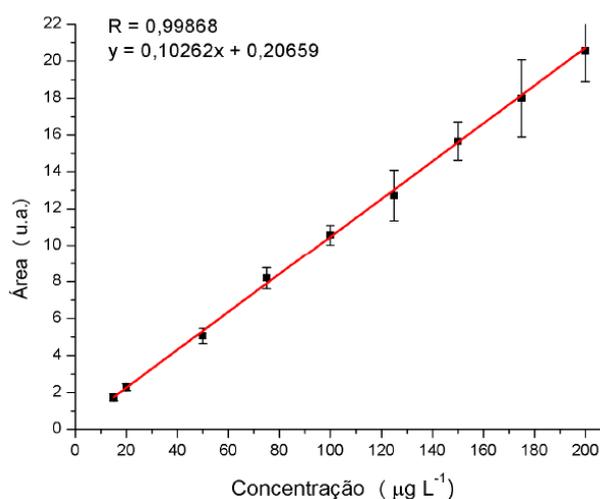
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação do método + DP (%)	CV (%)
45	101,6 ± 5,5	5,4
112	99,6 ± 10,3	10,4
180	95,8 ± 12,4	12,9

**Nota: DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação. Fonte: Lima (2017).**

## ANEXO C – Dados de validação da curva analítica para determinação do clorpirifós por HPLC-DAD

A curva de calibração do clorpirifós ( $T_R=8,6$  min) foi preparada em água de osmose com 0,2% de acetonitrila, em heptaplicata, nas concentrações de 15, 20, 50, 75, 100, 125, 175 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , demonstrada na sequência.

### Curva de calibração do CP por HPLC-DAD.



**Nota: Condições cromatográficas: coluna Poroshell EC120-C18;  $\lambda$ : 290 nm; FM: ACN:H<sub>2</sub>O (90:10); Volume de injeção: 50  $\mu\text{L}$ ; Vazão da FM: 0,4  $\text{mL min}^{-1}$ . Fonte: Utzig (2016).**

A partir dos parâmetros da curva de calibração calculou-se os valores de LD e LQ, expressos na tabela a seguir.

### Parâmetros de regressão da curva de calibração do CP por HPLC-DAD.

Parâmetro	Valor
Faixa linear do método	15 - 200 $\mu\text{g L}^{-1}$
Coeficiente linear	0,20659
Desvio do coeficiente linear	0,15893
Coeficiente angular	0,10262
Desvio do coeficiente angular	0,00381
Coeficiente de correlação ( $r^2$ )	0,99868
LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	15,48
LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	5,11

Fonte: Utzig (2016).

Na tabela abaixo estão expressos os valores de exatidão e precisão (n=3) do método de quantificação do clorpirifós por HPLC-DAD.

**Valores de exatidão e precisão do método de quantificação do CP por HPLC-DAD.**

Controles de qualidade	Exatidão (%)	CV (%)
CQB (44,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	95,22	3,03
CQM (102,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	91,46	7,96
CQA (160,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ )	98,65	2,59

**Nota: CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração; CV: coeficiente de variação (n=3). Fonte: Utzig (2016).**

**ANEXO D – Composição da água de diluição de *Daphnia magna***
**Reagentes utilizados nas soluções-estoque e volumes adicionados para preparar 1 L de meio M4 e água de diluição.**

Substância	Quantidade (g) para 1 L de solução	Volume adicionado ao meio M4 (mL)	Volume adicionado à água de diluição (mL)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	73,5	3,2	3,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123,3	0,8	0,8
KCl	5,8	0,8	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	64,8	0,8	0,8
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7,21		
LiCl	6,12		
RbCl	1,42		
SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,04	0,1	-
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,335		
ZnCl <sub>2</sub>	0,260		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,200		
NaNO <sub>3</sub>	0,548		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,719		
NaBr	0,032		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,126	0,5	-
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,00115		
KI	0,0065		
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,00438		
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	21,465	0,2	-
Na <sub>2</sub> EDTA.7H <sub>2</sub> O	0,500		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1991	5,0	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,286		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,368	0,5	-
Hidrocloreto de tiamina	0,750		
Cianocabalamina (vitamina B12)	0,010	0,1	-
D (+) Biotina	0,0075		

**Nota: M4: Meio de cultivo constituído de elementos traço e vitaminas. Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (2016).**

ANEXO E – Carta controle de *Daphnia magna*

Carta controle com resultados de CE<sub>50</sub> dos testes de sensibilidade de *D. magna*, utilizando sulfato de zinco heptahidratado.

