NATHALIE ZAMARIOLA

Estudo da mobilidade de micotoxinas em solo sob condições de clima tropical

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Zamariola, Nathalie
Z23e Estudo da mobilidade de micotoxinas em solo sob condições de clima tropical / Nathalie Zamariola. – Araraquara : [s.n.], 2016
140 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

1. Micotoxinas. 2. Etanol. 3. Aflatoxina. 4. Solos-degradação. 5. Solos-absorção e adsorção. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Nathalie Zamariola

Nascimento: 26/06/1985

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Rio Claro – SP

Estado civil: Solteira

Filiação: Carlos Alberto Zamariola e Sonia Ferro Zamariola

Profissão: Química

Nome em citações bibliográficas: ZAMARIOLA, N.

Formação Acadêmica/Titulação

2009 – 2011: Mestrado em Química

Instituição: Instituto de Química, Campus Araraquara-SP, Universidade Estadual Paulista

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Título da dissertação: Resíduos de pesticidas em tecido adiposo associado a órgãos reprodutivos: validação de método analítico e aplicação a animais de experimentação.

2004 – 2008: Graduação em Química – Bacharelado em Química Tecnológica

Instituição: Instituto de Química, Campus Araraquara-SP, Universidade Estadual Paulista

Estágio de conclusão do curso: Riclan - Indústria alimentícia

Supervisor do estágio: Aparecido de Freitas

Orientadora institucional da UNESP: Profa. Dra. Maria Aparecida Zaghete Bertochi

2015 – 2015: Programa Especial de Formação Pedagógica de Docentes – Licenciatura Plena em Química.

Instituição: Universidade de Franca, UNIFRAN

Atuação Profissional

2008 – 2008: Estagiária
Empresa: Riclan - Rio Claro/SP
Atividades: Controle de Qualidade - análises em matérias-primas e produtos; Desenvolvimento de Produtos - acompanhamento do processo de desenvolvimento e produção de confeitos.

2005 – 2008: Professora de Química
Empresa: Projeto CUCA (Curso Universitário do Campus de Araraquara)
Atividades: Professora de Química do Projeto CUCA (Curso Universitário do Campus de Araraquara). Trata-se de um curso pré-vestibular oferecido aos alunos carentes de Araraquara e região.

Produção Bibliográfica

ZAMARIOLA, N., TOLEDO NETTO, P., FRANCHI, C. A. S., CAMARGO, J. L. V, MARCHI, M. R. R. QuEChERS based method for pesticides analysis in adipose tissue associated with the ovaries. **Journal of Analytical Toxicology**. Submetido.

Principais participações em eventos e congressos nacionais e internacionais

ZAMARIOLA, N., MARCHI, M. R. R. Química verde: uso de etanol como fase móvel na determinação de Aflatoxina B1 e Zearalenona, por HPLC-FLD. Apresentação de Trabalho na 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Natal/RN), 2014.

ZAMARIOLA, N., CAMARGO, J. L. V., MARCHI, M. R. R. Avaliação da exposição de animais de experimentação a pesticidas: estudo de acumulação. Apresentação de Trabalho no XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicoloqia (Porto de Galinhas/PE), 2012.

ZAMARIOLA, N., CAMARGO, J. L. V., MARCHI, M. R. R. Determinação de resíduos de pesticidas em tecido adiposo associado aos ovários. Apresentação de Trabalho no 16º Encontro Nacional de Química Analítica (Campos do Jordão/SP), 2011.

ZAMARIOLA, N., CAMARGO, J. L. V., MARCHI, M. R. R. Determination of pesticides in adipose tissue associated with ovary rats using a modification of the QuEChERS method. Apresentação de Trabalho no 3rd. Latin American Pesticide Residue Workshop, Food and Environment (Montevideo, Uruguai), 2011.

NATHALIE ZAMARIOLA

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 13 de maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profª. Drª. Maria Lucia Ribeiro
Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara

Profª. Drª. Eny Maria Vieira
Instituto de Química – USP, São Carlos

Prof. Dr. Mario Sergio Galhiane
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru

DEDICATÓRIA

Á Deus, aos meus queridos pais e irmã.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente na minha vida, guiando meus passos.

Aos meus pais Carlos e Sonia e minha irmã Natassia, que sempre me incentivaram e apoiaram nos momentos de maior dificuldade. A vocês devoto o meu mais verdadeiro amor!

À minha querida orientadora e professora Dra. Mary Rosa por toda dedicação, ensinamentos e pela sincera amizade.

Ao Júnior pelo apoio, carinho e compreensão.

À todos do Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESCO) que de alguma forma me ajudaram e tornaram mais agradáveis meus dias de trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do curso, pelo incentivo e prontidão sempre que necessário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Muito obrigada!

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos naturalmente por uma variedade de fungos, que se desenvolvem em plantações ou nos cereais. Além de serem responsáveis por enormes prejuízos econômicos, as micotoxinas apresentam elevado risco à saúde humana e animal. Dentre as centenas de micotoxinas existentes destacam-se a AFB1 (carcinogênica) e a ZEA (estrogênica). Devido à preocupação com a saúde humana, no que diz respeito à contaminação dos alimentos, existem inúmeros países e comunidades econômicas que possuem legislações cada vez mais rígidas quanto aos níveis máximos permitidos e ao número de micotoxinas avaliadas, o que justifica os inúmeros trabalhos envolvendo o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação dessas substâncias em amostras alimentícias. Por outro lado, pouco tem sido feito para determinar o destino e a distribuição dessas substâncias no ambiente. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivos desenvolver um método para determinação das micotoxinas (AFB1 e ZEA) em solo, e avaliar a mobilidade das micotoxinas, por meio de testes de degradação e sorção/dessorção em solos de três cidades brasileiras. Para tanto, desenvolveu-se um método de determinação de AFB1 e ZEA em solo, utilizando um método de extração QuEChERS modificado, e analisado por CLAE-FLU utilizando etanol como fase móvel. O método apresentou seletividade adequada, recuperações entre 74 e 120%, precisão (CV máximo de 8%) e limite de quantificação de 45 ng g^{-1}. O efeito matriz e a linearidade foram estudados utilizando abordagem estatística criteriosa. Para os estudos de degradação o modelo não linear de Gustafson-Holden apresentou as melhores correlações com os dados experimentais, com tempo de meia vida (DT_{50}) de 5 a 10 dias para a AFB1 e de 1 a 3 dias para ZEA. Dos estudos que definiram a cinética de sorção, notou-se uma fase inicial, de rápida sorção (até 12 horas), seguida de uma etapa mais lenta. Das Isotermas avaliadas, a de Freundlich apresentou os melhores coeficientes de correlação. Pode-se observar que, para as duas micotoxinas, em mistura ou individual, os menores valores foram encontrados para o solo de Araraquara, o que é justificado pelos menores valores de argila e matéria orgânica, mostrando que as principais interações solo/micotoxina são as hidrofóbicas. Também foi observado e efeito sinérgico de sorção das micotoxinas em mistura, indicando que na presença de outra micotoxina, a sorção é favorecida. Os estudos de dessorção apontaram para um processo irreversível. Quanto à avaliação da mobilidade das micotoxinas, alguns modelos demonstraram o risco de dispersão da AFB1 e ZEA para o ambiente.

Palavras-chave: Micotoxinas. Etanol. Solo. Degradação. Sorção.

ABSTRACT

Mycotoxins are naturally occurring secondary metabolites of fungi that grow on agricultural products in the field and during storage. In addition to being responsible for huge economic losses, mycotoxins present a high risk to human and animal health. Among hundreds existing mycotoxins stand out the aflatoxin B1 (carcinogenic) and zearalenone (estrogenic). Due to concern for human health, in relation to contamination of food, there are many countries and economic community with increasingly stricter legislation as regards maximum levels and the number of evaluated mycotoxins, which explains the numerous studies involving the development of analytical methods for the quantification of these substances in food samples. On the other hand, little has been done to determine the fate and distribution of these substances in the environment. In this sense, this project aims to develop a method for determination of mycotoxins (AFB1 and ZEA) in soil, and evaluate the mycotoxins mobility through degradation and sorption/desorption tests in three Brazilian soils. Thus, we developed a method for determination AFB1 and ZEA in soil, using a QuEChERS modified method followed by HPLC-FLD with ethanol as mobile phase. The method validation process showed that were achieved a method with adequate selectivity, recovery (74-120%, for different concentrations of AFB1 and ZEA), precision (RSD below 8%) and the quantification limit (LQ) was 45 ng g^{-1}. The matrix effect and linearity was studied based in statistical approach. To degradation study, nonlinear Gustafson-Holden model showed the best correlation with experimental data, with half-life (DT_{50}) 5 to 10 days for AFB1 and 1 to 3 days to ZEA. In the studies that defined the kinetics sorption, was noted, an initial phase of rapid sorption (up to 12 hours), followed by a slower phase. The Freundlich isotherms showed the best correlation coefficients. It was noted for both mycotoxins, mixed or individually, the lowest values were found in the Araraquara soil, which is justified by the lower clay and organic matter amounts, proving that the main interactions soil/mycotoxin are hydrophobic. It was also observed synergic effect sorption of mixed mycotoxins, indicating that in the presence of other mycotoxin, sorption is favored. Desorption studies indicated an irreversible process. With respect to the evaluation of the mycotoxins mobility, some models have demonstrated the risk of AFB1 and ZEA environment dispersion.

Keywords: Mycotoxins. Ethanol. Soil. Degradation. Sorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	AFB1: estrutura molecular e propriedades físico-químicas	23
Figura 2 -	AFM1: Principal metabólito da AFB1	24
Figura 3 -	ZEA: estrutura molecular e propriedades físico-químicas	25
Figura 4 -	Mecanismo de formação dos principais metabólitos da ZEA	26
Figura 5 -	Distribuição ambiental das micotoxinas	32
Figura 6 -	Método QuEChERS desenvolvido para extração de AFB1 e ZEA de solo	50
Figura 7 -	Fluxograma do experimento para determinação da razão solo/solução, da estabilidade do analito e do tempo de equilíbrio	57
Figura 8 -	Fluxograma do experimento de conservação de massa	58
Figura 9 -	Fluxograma do experimento para determinação da cinética de sorção e de dessorção.	61
Figura 10 -	Fluxograma do experimento para determinação das isotermas de sorção e dessorção	63
Figura 11 -	Desenvolvimento do método cromatográfico para análise de AFB1 e ZEA por CLAE-FLU.	70
Figura 12 -	Nomógrafo: régua de força de eluição, destacado em vermelho a mudança de uma composição 45:55 (H_2O: ACN) em aproximadamente 30:70 (H_2O: MeOH)	71
Figura 13 -	Cromatograma (CLAE-FLU) obtido nas condições da Tabela 5: (A) etanol (B) Solução padrão dos analitos AFB1 (preto, 50µg L^{-1}) e ZEA (vermelho, 50µg L^{-1}), em etanol	74
Figura 14 -	Curvas analíticas e Gráficos de Resíduos para AFB1 e ZEA em etanol	76
Figura 15 -	Comparação do método de Bezerra (2014) com o método desenvolvido.	81
Figura 16 -	Sobreposição dos cromatogramas da solução padrão (em preto - AFB1 50µg L^{-1} e ZEA 250µg L^{-1}) comparada com o branco do método (vermelho) para avaliar a seletividade do método de extração	82
Figura 17 -	Curvas analíticas em etanol, no extrato da matriz e extraída para AFB1 e ZEA	84
Figura 18 -	Degradação das micotoxinas nos três diferentes solos	87
Figura 19 -	Aplicação do modelo linear de primeira ordem para as micotoxinas, nos três solos	89
Figura 20 -	Aplicação do modelo de Gustafson-Holden para as micotoxinas, nos três solos	90

Figura 21 - Curvas analíticas em etanol e Cloreto de cálcio 0,01M para AFB1 e ZEA 96

Figura 22 - Concentração em função do tempo para cada um dos analitos durante o experimento de sorção 97

Figura 23 - Cinética de sorção para a AFB1 nos solos de Araraquara (vermelho), Corbélia (azul) e Lavras (verde). 98

Figura 24 - Gráfico da cinética de sorção para a ZEA nos solos de Araraquara (vermelho), Corbélia (azul) e Lavras (verde). 99

Figura 25 - Correlação entre Kd e razão massa de solo/volume de solução Em destaque a interpolação de dados para escolha da melhor razão solo/solução para AFB1 (vermelho) e ZEA (azul). A 75 e 66 % de sorção, respectivamente. 101

Figura 26 - Cinética de sorção para AFB1 nos três tipos de solo, em mistura e individual 103

Figura 27 - Cinética de sorção para ZEA nos três tipos de solo, em mistura e individual 104

Figura 28 - Cinética de dessorção para AFB1 nos três tipos de solo, em mistura e individual 107

Figura 29 - Cinética de dessorção para ZEA nos três tipos de solo, em mistura e individual 108

Figura 30 - Aplicação do modelo de isoterma Linear, para AFB1 e ZEA, nos diferentes solos, em mistura e individualmente 111

Figura 31 - Aplicação do modelo de isoterma de Langmuir, para AFB1 e ZEA, nos diferentes solos, em mistura e individualmente 112

Figura 32 - Aplicação do modelo de isoterma de Freundlich, para AFB1 e ZEA, nos diferentes solos, em mistura e individualmente 113

Figura 33 - Comparação dos coeficientes (Kf) obtidos para os diferentes tipos de solo 116

Figura 34 - Comparação dos coeficientes (Kf) obtidos para os diferentes estudos: individual ou mistura 117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Alguns dos alimentos monitorados para micotoxinas no Brasil, União Europeia e Estados Unidos	20
Tabela 2 -	Micotoxinas de maior interesse toxicológico e econômico	22
Tabela 3 -	Ocorrência de micotoxinas no ambiente	28
Tabela 4 -	Métodos de análise de micotoxinas em diferentes tipos de matrizes ambientais e alimentícias	34
Tabela 5 -	Condições cromatográficas para determinação das micotoxinas	43
Tabela 6 -	Principais culturas contaminadas por AFB1 e ZEA	48
Tabela 7 -	Concentrações utilizadas para o estudo das isotermas em mistura e individual	62
Tabela 8 -	Critérios de mobilidade de acordo com o Diretório de Segurança de Pesticidas do Reino Unido (DSPRU).	66
Tabela 9 -	Comparação entre os diferentes métodos cromatográficos (n=6)	72
Tabela 10 -	Valores médios e coeficiente de variação do Tempo de retenção e da área dos analitos, indicando a precisão do método.	75
Tabela 11 -	Parâmetros da curva analítica para AFB1 e ZEA em etanol.	76
Tabela 12 -	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) instrumentais	77
Tabela 13 -	Resultados das análises das amostras de solo inseridas neste trabalho (efetuadas no Instituto Agronômico de Campinas)	78
Tabela 14 -	Resultados da análise da biomassa microbiana das amostras de solo inseridas neste trabalho (tratamento 1) realizadas pelo Laboratório de microbiologia do solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz De Queiroz"	79
Tabela 15 -	Comparação entre as curvas analíticas das micotoxinas em etanol, no extrato da matriz e a curva extraída	83
Tabela 16 -	Resultados do estudo da exatidão(recuperação) e precisão (CV%) do método (n=3).	85
Tabela 17 -	Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) do método de extração	86
Tabela 18 -	Concentração remanescente das micotoxinas em função do tempo (n = 2)	87
Tabela 19 -	Equações dos modelos linear e de Gustafson-Holden de degradação das micotoxinas.	91
Tabela 20 -	Valores de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$ e DT_{50}) e (DT_{90}) das micotoxinas, obtidos pelos modelos cinéticos de degradação	91

Tabela 21 - Valores percentuais de recuperação e coeficiente de variação para os analitos com diferentes filtros (n=5) 94

Tabela 22 - Valores percentuais de recuperação e coeficiente de variação para os analitos com diferentes filtros (n=5) 95

Tabela 23 - Resultados obtidos no estudo de conservação de massa, para AFB1 e ZEA 100

Tabela 24 - Valores de sorção e Kd para cada analito, nos três tipos de solo 101

Tabela 25 - Valores de sorção (%) para cada analito, nos estudos individuais e em mistura, para os três tipos de solo (n=2) 102

Tabela 26 - Valores de dessorção (%) para cada analito, nos estudos individuais e em mistura, para os três tipos de solo 106

Tabela 27 - Concentrações dos analitos na fase aquosa dos experimentos, ao atingirem o equilíbrio (48horas) 110

Tabela 28 - Dados de sorção obtidos pelas isotermas lineares, Langmuir e Freundlich para as micotoxinas individuais e em mistura, nos três solos 114

Tabela 29 - Concentrações dos analitos na fase aquosa dos experimentos de dessorção, ao atingirem o equilíbrio (48horas) 118

Tabela 30 - Dados de dessorção obtidos pelas isotermas lineares, Langmuir e Freundlich para as micotoxinas individuais e em mistura, nos três solos 120

Tabela 31 - Parâmetros e classificação do potencial de mobilidade das micotoxinas 122

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AF	Aflatoxinas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Assimetria
b	Coeficiente de Adsorção de Langmuir
C18	Octadecil Silano
C_e	Concentração na fase aquosa (equilíbrio)
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DLLE	Microextração líquido-líquido dispersiva
DON	Desoxinivalenol
d-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva
DSPRU	Diretório de Segurança de Pesticidas do Reino Unido
DT_{50}	Tempo de meia vida
DT_{90}	Tempo de desaparecimento de 90% da substância
EM	Espectrometria de Massas
ETE	Estação de tratamento de esgoto
EtOH	Etanol
FB	Fumosinas
FLU	Fluorescência
FM	Fase Móvel
GUS	Groundwater Ubiquity Score
HOAc	Ácido Acético
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K_d	Coeficiente de Sorção
K_{des}	Coeficiente de Dessorção
K_f	Coeficiente de Sorção de Freundlich
K_{oc}	Coeficiente de Sorção Normalizado
LD	Limite de Detecção

LLE	Extração Líquido-Líquido
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
NIV	Nivalenol
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OTA	Ocratoxina
p.a.	Grau Analítico
PAT	Patulina
PSA	Amina Primária e Secundária
Q_e	Concentração no solo (equilíbrio)
RAL	Lactona do ácido resorcíclico
rec	Recuperação
Rs	Resolução
Selet	Seletividade
SLE	Extração sólido-líquido
SPE	Extração em Fase Sólida
SPE	Extração em Fase Sólida
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
TLC	Cromatografia em camada delgada
t_R	Tempo de Retenção
ZEA	Zearalenona
α-ZOL	α-Zearalenol
β-ZOL	β-Zearalenol

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO DA TESE 18
2 INTRODUÇÃO 19
2.1 Micotoxinas 19
2.1.1 Aflatoxina B1 (AFB1) 24
2.1.2 Zearalenona (ZEA) 26
2.2 Estudos ambientais das micotoxinas 277
2.3 Métodos analíticos para determinação das micotoxinas 34
3 OBJETIVOS 41
4 MATERIAIS E MÉTODOS 42
4.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes 42
4.2 Equipamentos 42
4.3 Preparo da solução estoque dos padrões analíticos 42
4.4 Desenvolvimento do método cromatográfico 42
4.5 Verificação do desempenho do equipamento 43
4.5.1 Seletividade, identificação dos analitos e precisão 43
4.5.2 Linearidade e intervalo de trabalho – Construção das curvas analíticas 43
4.5.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) instrumental 47
4.6 Obtenção, tratamento e caracterização dos solos 47
4.6.1 Determinação da umidade e capacidade de campo das amostras de solo 49
4.7 Método de extração para análise de micotoxinas em solo 50
4.8 Validação do método de extração 51
4.8.1 Seletividade 51
4.8.2 Efeito Matriz 51
4.8.3 Precisão e exatidão 51
4.8.4 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) 52
4.9 Estudo de degradação/persistência 52
4.10 Estudo de sorção e dessorção 54
4.10.1 Escolha do filtro de seringa 56
4.10.2 Avaliação da resposta cromatográfica em solução de $CaCl_2$ 0,01M 56
4.10.3 Estudos preliminares 56
4.10.3.1 Razão solo/solução, estabilidade do analito e tempo de equilíbrio 56
4.10.3.2 Estudo de conservação de massa 58

4.11 Cinética de sorção e de dessorção 59
4.12 Isotermas de sorção e de dessorção 62
4.13 Avaliação da mobilidade das micotoxinas 65
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 68
5.1 Desenvolvimento do método cromatográfico 68
5.1.1 Comparação entre as condições cromatográficas 71
5.2 Validação do método cromatográfico 73
5.3 Caracterização dos solos 77
5.4 Método de extração 80
5.5 Validação do método 82
5.5.1 Seletividade e Efeito Matriz 82
5.5.2 Estudo de recuperação e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) do método 85
5.6 Estudo de degradação das micotoxinas em solo 86
5.7 Estudo de sorção e de dessorção das micotoxinas em solo 94
5.7.1 Estudo preliminar 1 - Escolha do filtro de seringa 94
5.7.2 Estudo Preliminar 2 - Avaliação da resposta cromatográfica em solução de $CaCl_2$ 0,01M 95
5.7.3 Estabilidade do analito 97
5.7.4 Determinação do tempo de equilíbrio, balanço de massa e da razão solo/solução 98
5.7.5 Cinética de Sorção 102
5.7.6 Cinética de dessorção 106
5.7.8 Isotermas de sorção 109
5.7.9 Isotermas de dessorção 118
5.7.10 Avaliação da mobilidade das micotoxinas 121
6 CONCLUSÕES 124
7 PERSPECTIVAS PARA CONTINUIDADE DO ESTUDO 126
REFERÊNCIAS 127
APÊNDICE 138

1 APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado busca fornecer dados para ajudar a entender como duas das mais importantes micotoxinas (AFB1 e ZEA) se comportam no ambiente. Como visto anteriormente, as micotoxinas avaliadas nesse estudo apresentam elevada toxicidade à humanos e outros animais, sendo imprescindível maiores informações a respeito dessas propriedades. Quanto à ZEA, já existem alguns dados buscando elucidar suas possíveis características como contaminante ambiental, mas ainda são inconclusivos. Já para a AFB1 muito pouco é sabido a respeito de seu comportamento no ambiente.

Nesse contexto, os possíveis meios de aporte para as micotoxinas no solo poderiam ser principalmente as culturas que se contaminam ainda no campo (e seus restos vegetais após a colheita), mas também os dejetos dos animais de criação ou pelo seu uso como adubo em plantações.

Esta investigação foi realizada por meio de estudos de persistência e mobilidade. O estudo de persistência mostra quanto tempo a micotoxina é capaz de permanecer no ambiente, já os estudos de sorção/dessorção apresentam dados valiosos sobre a interação da micotoxina com o solo, se é possível seu transporte pela água, podendo chegar aos rios (águas superficiais) ou águas subterrâneas.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos naturalmente por uma variedade de fungos (LANIER et al., 2009). No geral, esses fungos não são patógenos agressivos, mas algumas espécies podem invadir e colonizar o tecido das plantas antes da colheita ou durante o armazenamento (GRIESSLER et al., 2010) Os fatores que contribuem para a presença ou produção dessas substâncias em alimentos ou plantações incluem, além do armazenamento, condições ambientais e ecológicas, sendo que muitas vezes, a maioria desses fatores, está além do controle humano (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Estudos revelam a existência de pelo menos 300 diferentes micotoxinas (ZAIN, 2011), que são compostos orgânicos, com uma grande variedade de estruturas, abrangendo diferentes heteroátomos e grupos funcionais (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014). Sendo que, as produzidas pelos fungos pertencentes aos gêneros *Fusarium (F.)* e *Aspergillus (A.)* recebem atenção especial, pois são as mais perigosas para humanos e animais, além de apresentarem relevância econômica (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

A ocorrência natural destas micotoxinas é responsável por sérios prejuízos econômicos em diferentes setores, incluindo a agricultura e pecuária, afetando os alimentos de consumo humano e animal (MORENO et al., 2009). A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estimava, há quase uma década, que aproximadamente 25% dos cereais, e um quarto de toda produção agrícola mundial estivesse contaminada por, pelo menos, uma dessas substâncias (FREIRE et al., 2007).

Dentre os fatores ambientais que favorecem o crescimento dos fungos e o aparecimento das micotoxinas, os principais são temperatura e umidade elevadas (GRIESSLER et al., 2010; ZAIN, 2011), sendo que países tropicais, como o Brasil, possuem condições ambientais excelentes para o crescimento dos principais fungos responsáveis pela produção das micotoxinas (FREIRE et al., 2007).

Além de sua importância econômica, as micotoxinas recebem atenção especial devido às suas propriedades tóxicas (CURTICAPEAN et al., 2011) pois algumas estão classificadas dentre os mais importantes fatores de risco de enfermidades crônicas provenientes da dieta, maiores até mesmo que

contaminantes sintéticos, aditivos alimentícios ou resíduos de pesticidas (KUIPER-GOODMAN, 1998 apud SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010).

Os problemas à saúde causados pela ingestão de micotoxinas tanto nos seres humanos, quanto nos animais, são denominados micotoxicoses, e a gravidade desses problemas depende de diversos fatores, como tempo de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo e também ao possível efeito sinérgico com outros produtos químicos aos quais o indivíduo é exposto (PERAICA, et al., 1999).

Consequentemente, muitos efeitos estão relacionados com a ingestão de micotoxinas, especialmente carcinogenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, estrogenicidade, distúrbios reprodutivos, imunossupressão e irritação dérmica (CHERKANI-HASSANI; MOJEMMI; MOUANE, 2016).

As micotoxicoses são conhecidas há muito tempo, porém até os anos 1960 eram negligenciadas (VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007). Somente com a descoberta das aflatoxinas e dos seus prejuízos à saúde, começaram a ser desenvolvidos, gradativamente, regulamentos para limitar a exposição a micotoxinas por alimentos e também em ração animal. A princípio, as regulamentações eram estabelecidas apenas para as aflatoxinas, e em alguns países industrializados (VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007). Porém, a crescente preocupação com a saúde humana, no que diz respeito à contaminação dos alimentos, tem resultado na elaboração de legislações cada vez mais rígidas quanto aos níveis máximos permitidos e ao número de micotoxinas avaliadas, em diversos países (FREIRE et al., 2007).

No Brasil, desde fevereiro de 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, responsável por controlar os níveis máximos de contaminantes nos alimentos, aprovou o regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para as seguintes micotoxinas: aflatoxinas (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZEA) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

A Tabela 1 apresenta alguns dos alimentos que recebem valores para controle de micotoxinas, no Brasil, assim como na União Europeia e nos Estados Unidos.

Tabela 1 - Alguns dos alimentos monitorados para micotoxinas no Brasil, União Europeia e Estados Unidos.

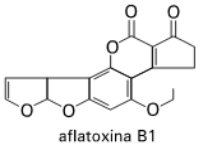
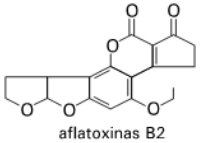
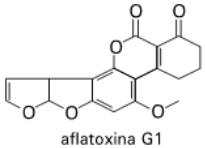
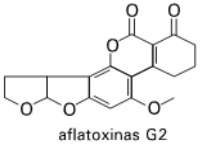
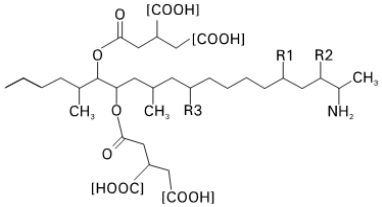
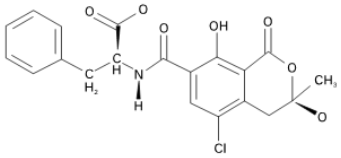
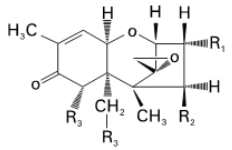
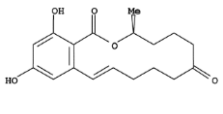
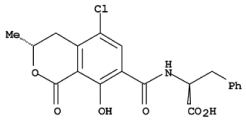
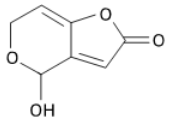
Micotoxinas	**Alimento**	**Brasil ($\mu g\ kg^{-1}$)**	**União Européia ($\mu g\ kg^{-1}$)**	**EUA ($\mu g\ kg^{-1}$)**
AFM1	Leite	0,5	0,05	0,5
AFB1 +AFB2 +AFG1 +AFG2	Cereais e seus produtos	5*	4	20 Para alimentos, em geral
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	1	0,1***	
	Milho e seus produtos	20	NA	
	Amendoim e derivados	20	NA	
	Frutas desidratadas e secas	10	2,0	
	Produtos de cacau e chocolate	5	na	
OTA	Cereais e seus produtos	10	3	NL
	Vinho, suco de uva e polpa de uva	2	2	
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	2	0,5	
DON	Cereais	750**	750	1000 para produtos a base de trigo
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	200	200	
Fumosinas (B1 +B2)	Milho de pipoca	2000	1000	3000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil	200	200	NA
ZEA	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	20	20	NL
	Farinha de trigo, e seus produtos	200	50	
	Cereais	200**	75	
PAT	Suco de maçã	50	10	NL
	Polpa de maçã	50	25	

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011, Commission of the European Communities, 2014, National Grain and Feed Association, 2011.
NA: não avaliada especificamente; NL: Micotoxina não legislada;* exceto milho e derivados; ** apenas arroz; *** Apenas AFB1

Como pode ser observado, dentre as três legislações apresentadas na Tabela 1, a utilizada nos Estados Unidos é a menos rígida, com os maiores níveis permitidos, e que contempla o menor número de micotoxinas. Já entre as legislações brasileira e da União Européia, a segunda apresenta, em sua maioria, os menores níveis permitidos, além de monitorar os níveis de outras três micotoxinas (T-2, HT-2 e a citrina), não adicionadas na Tabela 1.

Devido à grande preocupação com relação à exposição por micotoxinas via alimentação, somada ao crescimento de regulamentações que definem limites máximos toleráveis para essas substâncias em diversos tipos de alimentos, encontram-se na literatura, inúmeros trabalhos envolvendo o desenvolvimento de métodos para determinação de micotoxinas em matrizes alimentícias, que podem ser sumarizados em alguns trabalhos de revisão recentes (TURNER et al., 2015; SELVARAJ et al., 2015). Dentre as mais de 300 micotoxinas existentes, destacam-se algumas (Tabela 2), que são alvos da maioria dos trabalhos científicos envolvendo matrizes alimentícias, tanto por suas propriedades toxicológicas, quanto pelos prejuízos econômicos que podem causar.

Tabela 2 - Micotoxinas de maior interesse toxicológico e econômico.

Classe	**Aflatoxinas**	**Fumosinas**	**Tricotecenos**	**Lactonas do ácido resorcílico (RALs)**	**Ocratoxina A**	**Patulina**
Principais micotoxinas	B1, B2, G1, G2	B1, B2	Desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxina T2, toxina HT2	Zearalenona (ZEA)		
Principais Fungos produtores	*Aspergillus flavus; Aspergillus. parasiticus*	*Fusarium moniliforme*	*Fusarium* - diversas espécies	*Fusarium graminearum*	*Aspergillus. ochraceus,*	*Penicillium expansum*
Estruturas Químicas	 aflatoxina B1  aflatoxinas B2  aflatoxina G1  aflatoxinas G2	 B1: R1=OH; R2=OH; R3=OH B2: R1=OH; R2=OH; R3=H	 T2: R1= OAc HT2: R1=OH  DON: R1=OH; R2=H; R3=OH; R4=OH NIV: R1=OH; R2=OH; R3=OH; R4=OH			

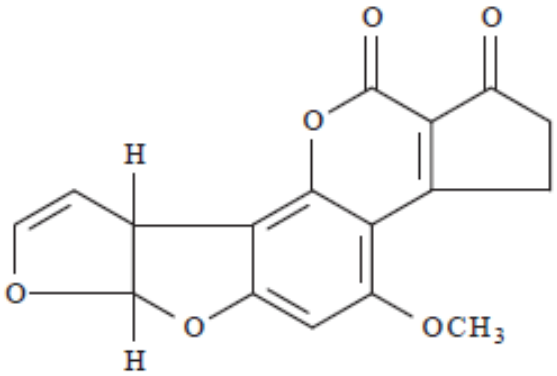
Fonte: Freite et al., 2007, Heidtmann-Bemvenuti et al., 2011, Mortensen, Strobel e Hansen, 2003.

Em meio às micotoxinas mais investigadas (Tabela 2), que também fazem parte do regulamento técnico da ANVISA, pode-se destacar a aflatoxina B1 (AFB1) e a zearalenona (ZEA), as quais foram selecionadas para este estudo, e estão detalhadas nos tópicos a seguir.

2.1.1 Aflatoxina B1 (AFB1)

A aflatoxina B1 cuja estrutura molecular e propriedades físico-químicas estão expostas na Figura 1, é produzida principalmente pelo fungo *Aspergillus flavus* (BENNETT; KLICH, 2003) sendo que algumas culturas tornam-se contaminadas ainda em campo (antes da colheita), enquanto que outras se contaminam após a colheita, quando armazenadas em condições de umidade e temperatura elevadas (DIENER et al., 1987). No Brasil, as aflatoxinas têm sido encontradas principalmente em amendoim e seus derivados, como por exemplo, a paçoca (SANTOS; LOPES; KOSSEKI, 2001) em amêndoas de castanha-do-Brasil e de caju (CASTRILLÓN; PURCHIO, 1988; FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000) em milho (CONCEIÇÃO, 2015) e em alimentos a base de milho (AMARAL et al., 2006). Na regulamentação da ANVISA, alguns alimentos como cereais, feijão, castanhas, amendoim, dentre outros, recebem valores para o controle de aflatoxinas. Pode-se observar que dentre as micotoxinas legisladas, as aflatoxinas são as que apresentam maior número de alimentos a serem fiscalizados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

Figura 1 - AFB1: estrutura molecular e propriedades físico-químicas.



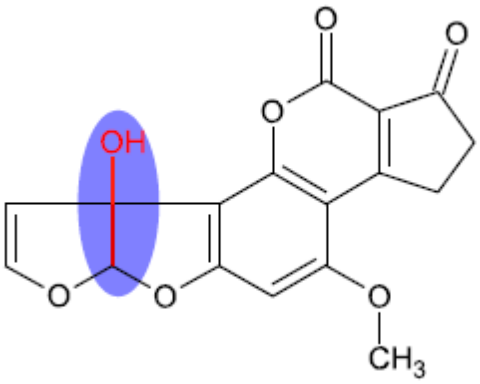
CAS: 1162-65-8
Fórmula molecular: $C_{17}H_{12}O_6$
Massa Molar: 312,3 g mol^{-1}
Solubilidade: ligeiramente solúvel em água 10-30 µg ml^{-1} (para todas as aflatoxinas); insolúvel em solventes apolares e solúvel em solventes orgânicos moderadamente polares, como o metanol (AFLATOXINS, 2012).

Fonte: elaborada pelo autor

As aflatoxinas afetam principalmente o fígado, sendo a AFB1 a mais potente, e também podem causar diminuição da produção animal (leite, ovos, ganho de peso, etc), são imunossupressoras, cancerígenas, teratogênicas e mutagênicas (MILLER; WILSON, 1994 apud RICHARD, 2007). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC) classificou as aflatoxinas como cancerígenas do Grupo 1 para os seres humanos, especialmente AFB1, que é considerada a substância cancerígena mais potente produzida naturalmente (AFLATOXINS, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2016a). Suas propriedades tóxicas, que podem levar à morte, são determinadas principalmente pelo duplo anel furano e pela lactona, que interagem com macromoléculas, como o DNA e as proteínas, e afetam o crescimento celular, podendo provocar carcinoma hepatocelular ou demais aflatoxicoses (KENSLER et al., 2011).

A aflatoxina M1(AFM1) é um metabolito hidroxilado da AFB1 (Figura 2), produzida no fígado, e encontrada no leite dos seres humanos e animais lactantes (FALLAH et al., 2009). Estima-se que de 0,3 até 6,2% da AFB1 seja metabolizada a AFM1 e excretada no leite (CREPPY, 2002). A AFM1 também é detectada nos produtos à base de leite, como iogurtes e queijos (IQBAL et al., 2015) e em carnes (HERZALLAH, 2009). E, assim como a AFB1, também é classificada como carcinogênica para os humanos pela IARC (AFLATOXINS, 2012)

Figura 2 - AFM1: Principal metabólito da AFB1

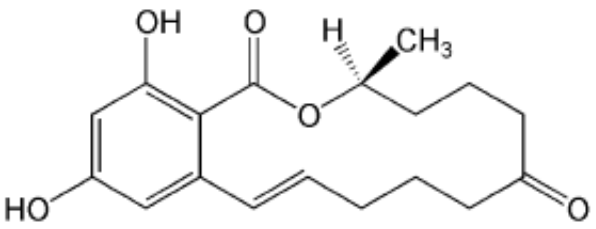


Fonte: adaptada de IQBAL et al., 2015.

2.1.2 Zearalenona (ZEA)

Classificada como uma lactona do ácido resorcíclico (RAL), sua estrutura (Figura 3), assemelha-se ao 17β-estradiol, principal hormônio produzido no ovário feminino, e possui flexibilidade suficiente para adotar uma conformação capaz de se ligar ao receptor de estrogênio de mamíferos. Desta maneira, apresenta atividade estrogênica, sendo capaz de interferir no sistema endócrino de animais e humanos. Tem sido apontada, ainda, como responsável por distúrbios reprodutivos em animais de criação, como gado, suínos e aves (SELVARAJ et al., 2015) e também é considerada um fator desencadeante do desenvolvimento precoce da puberdade em meninas (MASSART et al., 2008).

Figura 3 - ZEA: estrutura molecular e propriedades físico-químicas.



CAS: 17924-92-4
Fórmula molecular: $C_{18}H_{22}O_5$
Massa Molar: 318,4 g mol^{-1}
Solubilidade: ligeiramente solúvel em água (20 µg mL^{-1}); solúvel em solventes orgânicos como acetonitrila e metanol) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b);
pKa (RALs) = 8,5 a 11,5 (HARTMANN et al., 2007)

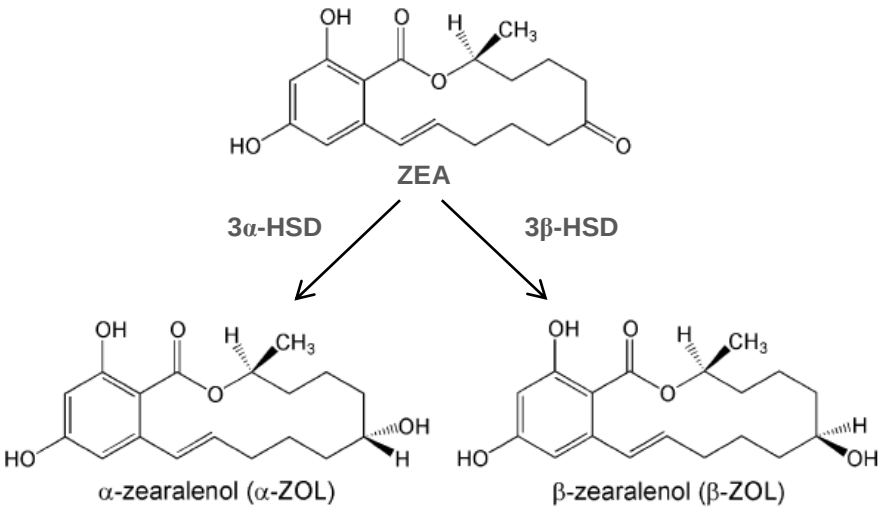
Fonte: elaborada pelo autor

A zearalenona é produzida por fungos que crescem em condições úmidas e frias, principalmente por *Fusarium graminearum*, em culturas de milho, trigo, cevada, sorgo e aveia. Em sorgo, trigo e milho ocorre na época de pré-colheita dos grãos, porém nas outras culturas os estudos são insuficientes para determinar se sua presença ocorreu no período pré ou pós-colheita. Durante o armazenamento, seu aparecimento é possível, mas pode ser controlado (RICHARD, 2007). No Brasil, estudos relatam sua presença em arroz (NUNES et al., 2003) e milho (ALVES et al., 2010). A ANVISA regulamenta sua fiscalização em diversos alimentos a base de milho, trigo e arroz (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

A biotransformação da ZEA pode ocorrer em fungos, plantas e em mamíferos, formando inúmeros metabólitos (METZLER; PFEIFFER; HILDEBRAND, 2010). Porém, os que recebem especial atenção, são α- zearalenol (α-ZOL) e β-zearalenol (β-ZOL).

O mecanismo exato de formação desses metabólitos (Figura 4) ainda não é conhecido (AIKO; MEHTA, 2015; KWAŚNIEWSKA; GADZAŁA-KOPCIUCH; CENDROWSKI, 2015), mas estudos sugerem, de forma simplificada, que a ZEA é inicialmente hidroxilada por meio da 3α e 3β hidroxisteroide dehidrogenase, formando os metabólitos α-ZOL e β-ZOL, e que posteriormente, tanto a ZEA quanto seus metabólitos podem ser conjugados ao ácido glicurônico. Assim como a ZEA, esses metabólitos são classificados como micoestrógenos, pois também apresentam atividade estrogênica (BENNETT; KLICH, 2003)

Figura 4 - Mecanismo de formação dos principais metabólitos da ZEA.



Fonte: adaptada de HARTMANN et al., 2007.

2.2 Estudos ambientais das micotoxinas

Enquanto inúmeras pesquisas foram desenvolvidas para avaliar o desenvolvimento e ocorrência das micotoxinas em produtos agrícolas, tais como os alimentos de consumo humano e animal, pouco tem sido feito para determinar o destino e a distribuição dessas substâncias no ambiente (BUCHELI et al., 2008;

HOERGER et al., 2009; KOLPIN et al., 2014; SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010). A Tabela 3 apresenta um sumário de trabalhos da literatura que mostram dados de ocorrência de micotoxinas no ambiente.

Tabela 3 - Ocorrência de micotoxinas no ambiente.

Referência	**País**	**Analitos**	**Matriz**	**Concentração encontrada (ng L^{-1} ou ng g^{-1})**
RIBEIRO; TIRITAN, 2015	Portugal	DON, ZEA, α-ZOL	Água de estuário	ZEA e α-ZOL: nd; DON: <59,5 - 412
KOLPIN et al., 2014	Estados Unidos	33 micotoxinas e metabólitos	Água superficial e efluente de ETE	94% das amostras com pelo menos um analito. água superficial (valores máximos): 1662 (DON); 96 (ZEA); 202 (α-ZOL) e 289 (β-ZOL); Efluente (valores máximos): 75 (DON); nd (ZEA); 1701 (α-ZOL) e 1828 (β-ZOL)
SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010	Suíça	33 micotoxinas	Água superficial, de drenagem e efluente de ETE	Encontradas 5 micotoxinas. Superficial: <LQ-12 (DON), <LQ-9 (NIV), <LQ (ZEA). Efluente: 16-39 (DON), nd (NIV e ZEA).
GROMADZKA et al., 2009	Polônia	ZEA	Água superficial, subterrânea, de drenagem, afluente e efluente de ETE	Água superficial: 0,7-43,7; Subterrânea: nd-0,5 Afluente: 1-5; Efluente: nd-2,7 Água de drenagem: 7,6-12,3
BUCHELI et al., 2008	Suíça	DON e ZEA	Água superficial e de drenagem	Água superficial: nd-22 (DON) e nd (ZEA)
HARTMANN et al., 2008	Suíça	ZEA	Solo, esterco, lodo de esgoto e trigo e milho (grãos moídos e o restante da planta - palha)	Solo: nd-8 Esterco: 8-333 Lodo de esgoto: nd-37. Grãos moídos: 260-2565 (trigo); 270-399 (milho) Palha: 86-16653 (trigo); 126-13763 (milho)
LAGANÀ et al., 2004	Itália	ZEA e metabólitos	Água superficial, afluente e efluente de ETE	Afluente: 3-18 (ZEA), nd-10 (α-ZOL) e nd-8 (β-ZOL); efluente: 3-10 (ZEA), nd-7 (α-ZOL) e nd-5 (β-ZOL) Superficial: 2-5 (ZEA), nd-3 (α-ZOL e β-ZOL)
PATERSON; KELLEY; GALLAGHER, 1997	Inglaterra	Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	Água de caixa d'água	AFB1 e AFG1: nd AFB2: 200-1700 AFG2: nd-100

Fonte: elaborada pelo autor

nd- não detectado, LQ- detectado abaixo do limite de quantificação, demais abreviações: Lista de siglas e abreviaturas

Segundo Schenzel, Hungerbühler e Bucheli (2012) existem três principais fontes de contaminação ambiental por micotoxinas, considerando trabalhos que relatam a ocorrência destas substâncias e seus metabolitos em água superficial de diversos países (BUCHELI et al., 2008; SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010; LAGANÀ et al., 2004; KOLPIN et al., 2014; GROMADZKA et al., 2009).

O primeiro meio de aporte é pela lixiviação e escoamento da água de culturas infectadas por fungos, e consequentemente, contaminadas por micotoxinas. A emissão de micotoxinas através de campos cultivados com trigo ou milho, infectados pelo fungo *Fusarium graminearum*, foi investigada mais detalhadamente por Hartmann et al. (2007), que relataram a presença de ZEA (concentrações de até 30 ng L^{-1}) em água de drenagem. Bucheli et al. (2008) também detectaram a presença de micotoxinas neste mesmo tipo de matriz. Desoxinivalenol (DON) foi quantificada em concentrações que chegaram a 4,9 µg L^{-1}, muito superior às encontradas para a ZEA (máximo de 35 ng L^{-1}), possivelmente devido à maior contaminação da cultura pela DON somada a maior solubilidade em água, o que facilita no transporte da substância por escoamento. Em um trabalho similar, Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli (2010) observaram a presença de DON, e de outras duas micotoxinas (nivalenol e beauvericina) em águas de drenagem chegando a 23, 8 e 10 ng L^{-1}, respectivamente. ZEA não foi detectada. Os valores encontrados nesses estudos, para água de drenagem, não estão dispostos na Tabela 3 por não serem valores encontrados no ambiente, uma vez que as plantações são de campos experimentais, onde foram favorecidas as infecções por fungos.

Outros dois trabalhos, mais antigos, avaliaram a possibilidade de lixiviação de micotoxinas. O primeiro é um estudo com AFB1 e FB1, onde observou-se que a presença de microrganismos, juntamente com o tipo de solo, são fatores que influenciam no processo de lixiviação (MADDEN; STAHR, 1993). Já Williams et al. (2003) estudaram a lixiviação de FB1 em solos arenosos e argilosos, e concluíram que, enquanto uma parcela da micotoxina permanece firmemente sorvida no solo, uma outra porção, sob certas condições ambientais pode ser liberada e se tornar biologicamente disponível concluindo que existe a possibilidade de contaminação de águas subterrâneas por esta micotoxina.

O segundo principal meio de aporte das micotoxinas ao ambiente é através da excreta de animais, pela criação extensiva de animais de corte ou leiteiros, que

defecam diretamente no solo, ou pela utilização de esterco como fertilizante (adubo). Em um experimento, onde vacas leiteiras foram alimentadas com ração contendo ZEA por um período de duas semanas, não foi possível detectar os analitos na urina, mas verificou-se a presença de ZEA e metabólitos α-ZOL e β-ZOL nas fezes de 13 dos 14 animais avaliados, com concentrações de até 381, 191 e 230 μg dia^{-1}, respectivamente (SEELING et al., 2005). Zearalenona também foi detectada em esterco de gado, em até 70 ng g^{-1}, no trabalho desenvolvido por Hartmann et al. (2008).

A excreção humana, que chega ao ambiente através de sistemas de esgoto, é a terceira principal fonte de micotoxinas no ambiente. Alguns trabalhos relatam a presença da ZEA e seus metabólitos α-ZOL e β-ZOL em afluentes (concentrações máximas de 18, 10 e 8 ng L^{-1}, respectivamente) e efluentes de estação de tratamento de esgoto (10, 7 e 5 ng L^{-1}, respectivamente) (GROMADZKA et al., 2009; LAGANÀ et al., 2004).

Outros trabalhos merecem destaque na elucidação do comportamento das micotoxinas no ambiente, como o desenvolvido por Kolpin et al. (2014) que avaliaram amostras de água superficial e de efluentes de ETE (estação de tratamento de esgoto) quanto a presença de 33 micotoxinas (dentre elas a ZEA) em diversos estados dos Estados Unidos. Em 94% das amostras analisadas, foi encontrado pelo menos um dos analitos, e a ZEA foi detectada em 26% das amostras, chegando a uma concentração de até 96 ng L^{-1}. Os dados obtidos evidenciaram que, tanto a agricultura, quanto a urbanização são fontes de micotoxinas no ambiente.

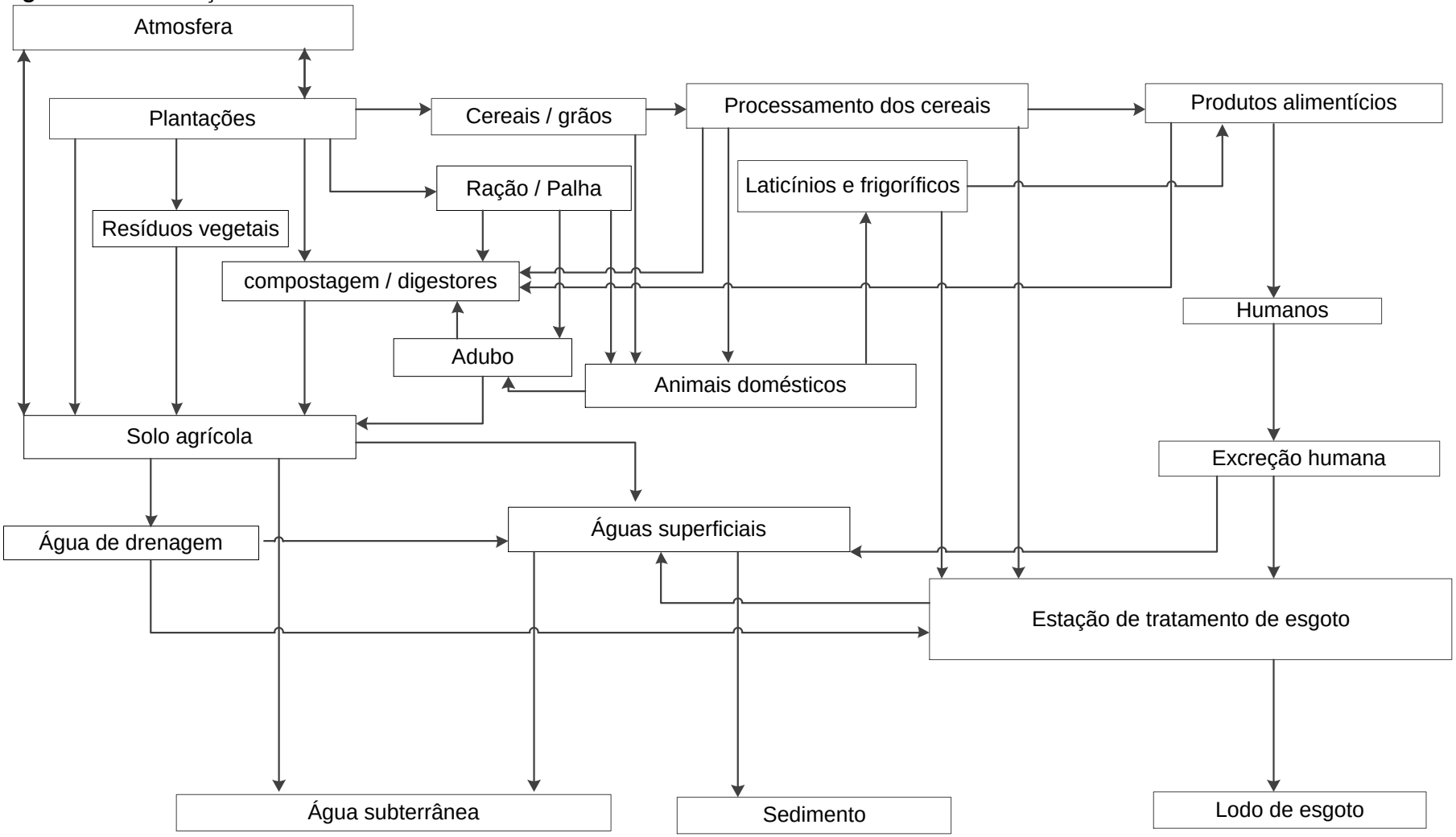
Gromadzka et al. (2009) avaliando a presença de ZEA em diferentes amostras ambientais de água (diversos rios, drenagem, água subterrânea e água de estação de tratamento de esgoto – afluente e efluente) da Polônia, concluíram que solo contaminado seria a maior fonte de ZEA, por meio de lixiviação para água superficial (rios) e para água subterrânea.

Quanto a estudos de degradação, Mortensen, Strobel e Hansen (2006), avaliaram o tempo de meia vida da OTA (0,2 a 1,2 dias) e ZEA (6,4 a 16,0 dias) em três tipos diferentes de solos dinamarqueses (arenoso, argiloso e solo com elevado teor de matéria orgânica, a turfa) que apresentaram rápida degradação (em temperatura de 18ºC e 60% da capacidade de campo), indicando que a possível contaminação do ambiente com essas substâncias é pequena. Em outro estudo,

ZEA juntamente com DON, também foram investigadas em um trabalho de possível contaminação ambiental, em um campo de cultivo de milho contaminado pelo fungo produtor destas micotoxinas. O estudo mostra que DON apresenta maior poder de contaminação ambiental, por apresentar maiores concentrações em água de drenagem (4,9 µg L-1 para DON e 35 ng L^{-1} para ZEA), mas também não descarta o problema com relação à ZEA (BUCHELI et al., 2008).

Complementando as informações descritas acerca da caracterização e distribuição das micotoxinas no ambiente, Hartmann et al. (2008), com base em diversos trabalhos (a maioria já citado neste tópico) sugeriram um esquema de distribuição ambiental das lactonas do ácido resorcíclico (RALs), classe de micotoxinas que contempla a ZEA e seus metabólitos, como ilustrado pela Figura 5, na qual pode-se observar que são inúmeras as rotas de aporte ambiental para as RALs e, possivelmente para outras micotoxinas, que possuem fontes em comum.

Figura 5 – Distribuição ambiental das micotoxinas.



Fonte: adaptada de Hartmann et al. (2008)

.

Apesar de estudos demonstrando o potencial de dispersão das micotoxinas no ambiente e do conhecimento dos efeitos biológicos deletérios que possuem, os trabalhos encontrados na literatura enfocam apenas a zearalenona e seus metabólitos, e mesmo assim, ainda existem controvérsias e lacunas a respeito da mobilidade e persistência dessa substância no ambiente. Quanto à AFB1, quase nenhuma informação do seu aporte e dispersão ambiental foi obtida até agora, o que é extremamente falho, uma vez que suas propriedades tóxicas são conhecidas desde a década de 60.

2.3 Métodos analíticos para determinação das micotoxinas

A determinação das micotoxinas em matrizes de interesse ambiental como água, solo, plantas, adubo, dentre outras, é de extrema importância para avaliar a ocorrência, transporte e destino dessas substâncias no ambiente, uma vez que apresentam características extremamente tóxicas aos humanos e outros animais. Por outro lado, a sua análise representa uma tarefa difícil, devido à alta complexidade dessas matrizes e as baixas concentrações normalmente encontradas.

A Tabela 4 apresenta uma breve descrição de métodos analíticos desenvolvidos para este fim, selecionados da literatura, incluindo matrizes ambientais e alimentícias. Dentre os inúmeros trabalhos que abordam métodos para a determinação de micotoxinas em alimentos, escolheu-se inserir na Tabela 4, alguns de matrizes sólidas, e/ou que utilizaram o sistema CLAE-FLU para a quantificação dos analitos, por se tratar da instrumentação escolhida para o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 4 - Métodos de análise de micotoxinas em diferentes tipos de matrizes ambientais e alimentícias. (Continua)

Referência	Matriz/Analitos (micotoxinas)	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnica de análise
DZUMAN et al., 2015	Alho poró, trigo e chá/ Pesticidas, toxinas e 55 micotoxinas	Método QuEChERS 1) extração sólido-líquido com ACN e partição 2) d-SPE com C18	CLAE-EM/EM FM: tampão acetato de amônia/MeOH Coluna:C18
EDIAGE; VAN POUCKE; DE SAEGER, 2015	Sorgo/ 23 micotoxinas	1) extração sólido-líquido com MeOH/ACN/água 2) lavagem com hexano 3) Em parte do extrato foi realizada SPE com coluna amina e eluição com MeOH/ACN/água; Na segunda parte do extrato foi realizada LLE com diclorometano e ácido fórmico.	CLAE-EM/EM FM: água/MeOH/ ácido acético Coluna:C18
RIBEIRO; TIRITAN, 2015	Água de estuário/DON, ZEA, α-ZOL	1)SPE: Cartucho OASIS HLB; eluição com MeOH 2) SPE: Cartucho sílica; eluição com MeOH	CG-EM (derivatização com MSTFA) Coluna capilar Zebron (5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano)
EMÍDIO; da SILVA; MARCHI, 2014	Água de rio/ ZEA e metabólitos	DLLE: solvente de extração bromociclohexano	CLAE–EM/EM FM: água acidificada com ácido fórmico/ACN/MeOH Coluna: C18
KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2014	Arroz/ AFB1 e ZEA e outras 12 micotoxinas	Método QuEChERS 1) extração sólido-líquido com ACN acidificada e partição 2)d-SPE com $MgSO_4$, PSA e C18	CLUE – EM/EM ACN/MeOH/tampão formiato de amônio e ácido fórmico Coluna:C18
KOLPIN et al., 2014	Água de rio e efluente de ETE/33 micotoxinas e metabólitos	1)SPE: Cartucho OASIS HLB; eluição com MeOH	CLAE-EM/EM FM: água/ACN Coluna: C18
LAI et al., 2013	Arroz/AFB1, AFB2 e OTA	1)Extração sólido-Líquido com ACN/água/ ácido acético 2)DLLE: solvente de extração: clorofórmio	CLAE-FLU ACN/MeOH/água acidificada com ácido fosfórico Coluna:C18

Tabela 4 - Métodos de análise de micotoxinas em diferentes tipos de matrizes ambientais e alimentícias. (Continuação)

Referência	Matriz/Analitos (micotoxinas)	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnica de análise
YOGENDRARAJAH et al., 2013	Temperos/ 17 micotoxinas	Método QuEChERS 1) extração sólido-líquido com MeOH acidificado e partição (sem etapa de clean-up)	CLUE-EM/EM FM: Metanol/água; tampão ácido fórmico/formiato de amônio Coluna:C18
SIRHAN; TAN; WONG, 2011	Macarrão/aflatoxinas	Método QuEChERS 1)extração sólido-líquido com MeOH/ACN/Água e partição (sem etapa de clean-up)	CLAE-FLU FM: água/MeOH/ACN Coluna: C18
RAHMAN; JINAP, 2010	Cereais/ AFs, ZEA, OTA	1) extração sólido-líquido com MeOH/água 2) SPE coluna de imunoafinidade e eluição com MeOH acidificado	CLAE-FLU FM: água acidificada/ACN/MeOH Coluna: C18
SCHENZEL; SCHWARZENBACH ; BUCHELI, 2010	Água superficial, de drenagem e efluente de ETE / 33 micotoxinas	1) SPE: cartucho OASIS HLB; eluição com MeOH	CLAE-EM/EM FM: água/MeOH acidificado com ácido acético Coluna: C18
GROMADZKA et al., 2009	Água superficial, subterrânea, de drenagem, afluente e efluente de ETE/ ZEA	SPE: Coluna de Imunoafinidade; eluição com MeOH	CLAE-FLU e DAD FM: água/ACN/MeOH Coluna: C18
BUCHELI et al., 2008	Água superficial e de drenagem/ DON e ZEA	1) SPE: cartucho OASIS HLB; eluição com acetato de etila	CLAE-EM/EM FM: água/MeOH, tamponados com acetato de amônia Coluna: C18
HARTMANN et al., 2008	Solo, esterco, lodo de esgoto e plantas (trigo e milho)/ ZEA	Solo: Extração Soxhlet com MeOH, 18horas Esterco e planta: SLE com ACN/água (84:16, v/v), 4horas. Lodo de esgoto: Extração Soxhlet com MeOH/tolueno (80:20, v/v), 18 horas.	CLAE–EM/EM FM: água/ACN, tamponados com acetato de amônia Coluna: C18

Tabela 4 - Métodos de análise de micotoxinas em diferentes tipos de matrizes ambientais e alimentícias. (Conclusão)

Referência	Matriz/Analitos (micotoxinas)	Tratamento da amostra (simplificado)	Técnica de análise
HARTMANN et al., 2007	Água de drenagem, água de rio, efluente de ETE/ ZEA e metabólitos	SPE: cartucho C18; eluição com ACN	CLAE–EM/EM FM: água/ACN; tamponados com acetato de amônia Coluna: C18
LAGANÀ et al., 2004	Água superficial, afluente e efluente de ETE/ Desreguladores endócrinos (ZEA e metabólitos)	SPE: Cartucho OASIS HLB ; eluição com diclorometano/MeOH (50:50, v/v)	CLAE–EM/EM FM: água/ACN Coluna: C18
MORTENSEN; STROBEL; HANSEN, 2003	Solo/ ZEA e OTA	1) SLE: MeOH/água (9:1) 2) SPE: cartucho C18; eluição com MeOH	CLAE-FLU FM: água acidificada com ácido fosfórico/MeOH Coluna Fenil-Hexil
PATERSON; KELLEY; GALLAGHER, 1997	Água de caixa d'água / Aflatoxina B1, B2, G1 e G2	1) Clean-up com Coluna de imunoafinidade; eluição com MeOH	CLAE-FLU FM: água/MeOH/ACN Coluna: C8
MADDEN; STAHR, 1993	Água e Solo (experimento lixiviação)/ AFB1 e FB1	Para AFB1 Água: LLE: diclorometano/água (1:1) Solo:1) SLE: ACN/água (9:1) 2) Clean-up: diclorometano Para FB1 Água:1) Extração com ACN/água (1:1) 2) Clean-up: SPE cartucho C18 e eluição com ACN/água (15:85)	TLC- FLU

Fonte: elaborada pelo autor

Os métodos de análise de micotoxinas, como ocorre para a determinação de outros microcontaminantes orgânicos, envolvem duas etapas principais: o isolamento dos analitos da matriz (tratamento da amostra) e a instrumentação analítica para sua determinação. A etapa de tratamento da amostra inclui a extração dos analitos, a purificação do extrato (clean-up) e a concentração dos analitos para quantificação.

De maneira geral, observando a Tabela 4, pode-se afirmar que a grande maioria dos trabalhos de caráter ambiental avaliam as matrizes aquosas (água de drenagem, superficial, subterrânea, afluente e efluente de ETE) e, portanto, utilizam, como principal tratamento, a extração em fase sólida (SPE), na qual a extração é realizada juntamente com a pré-concentração. Os adsorventes mais utilizados na SPE são a sílica modificada (C18), ou as fases poliméricas (como a HLB, que apresenta dois monômeros em sua composição, um de caráter hidrofílico e outro lipofífico). Também são utilizadas colunas de imunoafinidade, que se baseiam na tecnologia de ligação específica entre o anticorpo e o analito, possuindo grande seletividade. Outra informação importante é a existência de trabalhos mais recentes, que focam em técnicas de análise miniaturizadas, como a DLLE, que utiliza apenas alguns mililitros de solvente extrator, sendo assim mais amigável ao meio ambiente (EMÍDIO; DA SILVA; MARCHI, 2014).

Para as poucas amostras ambientais sólidas relatadas na literatura, realiza-se primeiramente uma extração sólido-líquido (SLE) com solventes com grupos polares, como ACN, metanol, ou misturas desses solventes com água. E, quando necessário, utiliza-se a etapa de clean-up com SPE ou até mesmo uma extração líquido-líquido.

Como são escassos os trabalhos desenvolvidos para matrizes sólidas ambientais, optou-se por discutir alguns métodos desenvolvidos para as amostras de alimentos sólidas. Pois esta discussão é importante para propor um método de determinação das micotoxinas (AFB1 e ZEA) em solo, imprescindível para o estudo ambiental proposto nesta tese. Como já foi relatado anteriormente, são inúmeros os trabalhos acerca das micotoxinas em alimentos, como muito bem exposto em trabalhos de revisões (SELVARAJ et al., 2015; TURNER et al., 2015).

Para as amostras de alimentos (apresentadas na Tabela 4), além dos métodos de extração e clean-up já discutidos para as amostras ambientais, pode-

se destacar a utilização do método denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), proposto em 2003 por Anastassiades e Lehotay, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (PRESTES et al., 2009). A princípio, o método foi utilizado para análise de pesticidas em matrizes alimentícias, mas hoje, diversos são os trabalhos que reportam sua aplicação, com algumas modificações, para as mais variadas matrizes e analitos (ASENSIO-RAMOS et al., 2010; COSTAIN et al., 2008; PINTO et al., 2010; PRESTES et al., 2009; BEZERRA, 2014). Este método vem sendo utilizado com sucesso em amostras sólidas, pois além da etapa de extração, também realiza o clean-up do extrato, com uma extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) onde não é necessário o cartucho (extrato é apenas agitado com os sorventes).

O método original consiste primeiramente em uma extração com acetonitrila, na presença de água, sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. Desta forma, devido à hidratação do sulfato de magnésio ocorre um aumento na temperatura do extrato que ajuda na extração dos analitos e a adição do cloreto de sódio faz com que haja a separação das fases (acetonitrila e água) (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003). Após a extração é realizado o clean-up denominado extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com uma porção do extrato orgânico, onde o principal adsorvente é a PSA (amina primária secundária), uma sílica modificada com uma cadeia carbônica e dois agrupamentos amínicos (um primário, e o outro secundário), o que confere à molécula uma estrutura bidentada, capaz de reter fortemente compostos polares presentes na matriz. Para as matrizes que apresentem interferentes de menor polaridade, é comum a utilização de outros adsorventes apolares, como o C18 (CUNHA et al., 2007; LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005).

Como pode-se observar nos trabalhos descritos na Tabela 4, que utilizaram a técnica QuEChERS, foram realizadas várias modificações ao método original, como a utilização de diferentes solventes de extração, e também a não necessidade de realização do clean-up.

Quanto às técnicas cromatográficas de análise empregadas, a cromatografia gasosa é evitada para esse tipo de analito, uma vez que, para sua utilização, é necessária a realização de uma etapa de derivatização dos analitos (AMELIN; KARASEVA; TRET'YAKOV, 2013; CUNHA; FERNANDES, 2010). Já a

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é amplamente utilizada, onde destacam-se dois tipos de detectores, o espectrômetro de massas (EM) e o detector de fluorescência (FLU), que pode ser utilizado em moléculas que apresentam fluorescência, altamente seletivo.

Apesar de ser extensamente utilizada em trabalhos de caráter ambiental, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como o próprio nome sugere, utiliza solventes como fase móvel (FM) para promover a separação dos analitos. Estima-se que são produzidos, anualmente, 34 milhões de litros de resíduos provenientes de análises com CLAE (GABER et al., 2011). Este dado torna-se ainda mais preocupante ao considerarmos que dentre os solventes mais empregados como fase móvel destacam-se a acetonitrila (ACN) e o metanol (MeOH), que podem apresentar efeitos deletérios ao meio ambiente, e também aos analistas que estão rotineiramente expostos (HENDERSON et al., 2011). Considerando-se a revisão apresentada na Tabela 4, 100% dos métodos descritos, empregando cromatografia líquida, utilizam como FM metanol, acetonitrila, ou até mesmo uma mistura desses dois solventes.

Como alternativa ainda não explorada na determinação de micotoxinas por CLAE, o etanol é um solvente biodegradável, não tóxico, e pode ser obtido por fontes renováveis. A troca de solventes tóxicos e provenientes de fontes não renováveis, como ACN e MeOH, por um solvente não tóxico e proveniente de fonte renovável, faz com que o método atenda alguns dos preceitos da química verde (POLIAKOFF; LICENCE, 2007).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Como os estudos de caráter ambiental, principalmente os que caracterizam o comportamento das micotoxinas no ambiente, são escassos e inconclusivos, este trabalho tem como objetivo geral fornecer dados para ajudar a entender como duas das mais importantes micotoxinas (AFB1 e ZEA) se comportam no ambiente, avaliando a mobilidade e persistência nas condições climáticas brasileiras, por meio de estudos de degradação, sorção e dessorção.

Objetivos específicos

- ✓ Otimizar e validar um método cromatográfico por CLAE-FLU para a determinação simultânea das micotoxinas (AFB1 e ZEA), buscando a utilização do etanol como fase móvel, afim de diminuir o uso de solventes de maior toxicidade;
- ✓ Desenvolver e validar um método de fácil aplicação para determinação das micotoxinas em solo;
- ✓ Determinação do tempo de meia vida das micotoxinas em solo, por meio de estudo de persistência;
- ✓ Determinação da cinética de sorção e de dessorção das micotoxinas, em diferentes tipos de solos, em mistura e individualmente;
- ✓ Determinação das isotermas de sorção e de dessorção nos três diferentes solos, em mistura e individualmente;
- ✓ Avaliar o potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, aplicando modelos de dispersão de contaminantes no ambiente, utilizando os dados obtidos pelos estudos de degradação e sorção das micotoxinas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes

Os padrões analíticos das micotoxinas Aflatoxina B1 (98,0%) e Zearalenona (99,0%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados foram metanol, acetonitrila e etanol (grau HPLC, J. T. Baker); ácido acético (Chemis); água de alta pureza obtida do sitema Milli-Q (Millipore). Foram ainda utilizados: C18 (45 µm, Sigma Aldrich); PSA (amina primaria e secundária - 47-60 µm, Varian; 45 µm, Agilent); cloreto de sódio (p.a., Sigma Aldrich) e cloreto de cálcio dihidratado (75%, J.T. Baker).

4.2 Equipamentos

Cromatógrafo à líquido de alta eficiência (CLAE) (Varian, modelo 920-LC) equipado com bomba ternária, injetor automático, detectores de fluorescência e ultravioleta, em série nesta sequência e software Galaxie para aquisição dos dados.

Ultrassom Cleaner Thornton; balança analítica Mettler Toledo AG 245 (0,1mg); Centrífuga Microproces Quimis; agitador de tubos Phoenix (Vortex); estufa Fanem, modelo 315SE; incubadora refrigerada Marconi MA830.

4.3 Preparo da solução estoque dos padrões analíticos

A solução estoque de cada micotoxina foi preparada em metanol na concentração de 1000 mg L^{-1}. A partir destas, foram preparadas soluções intermediárias nas concentrações de 100 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1}, as quais foram utilizadas para preparar as soluções de trabalho, em diferentes concentrações, dependendo do estudo realizado. As soluções estoque e intermediária foram armazenadas em frascos âmbar, vedadas com *parafilm* e mantidas à -18ºC. Para cada estudo, uma nova solução estoque foi preparada.

4.4 Desenvolvimento do método cromatográfico

Nesta etapa do trabalho aplicou-se o conceito da Química verde, ao desenvolver um método que utiliza como fase móvel o solvente etanol (EtOH), que apresenta menor toxicidade quando comparado com os solventes geralmente utilizados em cromatografia líquida (acetonitrila - ACN e metanol - MeOH). A Tabela 5 apresenta os parâmetros cromatográficos otimizados para análise das micotoxinas.

Tabela 5: Condições cromatográficas para determinação das micotoxinas.

Equipamento	Varian 920-LC
Coluna cromatográfica	Gemini – C18 (150 mm x 4,6 mm de diâmentro interno x 5 µm tamanho da partícula, marca Phenomenex)
Temperatura da coluna	50ºC
Componentes da fase móvel	(A) água acidificada a 0,1% de ácido acético, (B) etanol
Eluição	Isocrática 0 a 1min: 45% A; 55%B Gradiente 1 a 2 min: 30% A; 70% B Isocrática 2 a 5 min:30% A; 70% B Tempo de equilíbrio: 4 minutos
Vazão da fase móvel	1 mL min^{-1}
Volume de injeção	20 µL
Detecção por FLU	Aflatoxina B1 (Excitação:365 nm/ Emissão: 425 nm) Zearalenona (Excitação: 275 nm/ Emissão: 450 nm)

Fonte: elaborada pelo autor

4.5 Verificação do desempenho do equipamento

Com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados analíticos para os ensaios realizados em solução, ou seja, os que não utilizam o processo de extração, o sinal cromatográfico foi validado para os seguintes critérios: seletividade, precisão, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e de quantificação.

4.5.1 Seletividade, identificação dos analitos e precisão

A seletividade do método pode ser comprovada com a injeção do solvente, para verificar que não há interferentes co-eluindo com as micotoxinas. A identificação dos analitos foi baseada nos tempos de retenção obtidos pela análise da solução de cada padrão individual. A precisão do método foi verificada pelo coeficiente de variação apresentado pelo tempo de retenção e pela área de cada concentração utilizada para construção da curva analítica.

4.5.2 Linearidade e intervalo de trabalho – Construção das curvas analíticas

A linearidade do método foi obtida seguindo o documento de Orientação sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010). Primeiramente verificou-se a ausência de valores discrepantes pelo teste de resíduo Jacknife (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) e posteriormente a homocedasticidade pelo

teste de Levene (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Também foram construídos os gráficos de resíduos em função da concentração. Quando os dados não apresentavam homocedasticidade, nem com a remoção dos pontos com maior resíduo (no máximo dois pontos), foi utilizado um fator de ponderação dos coeficientes, conforme descrito por Almeida, Castel-Branco e Falcão (2002).

Para verificar o intervalo linear de trabalho, foram preparadas soluções mistas dos analitos (em etanol) em 13 concentrações diferentes, variando de 2,5 a 1500 µg L^{-1}. Para a construção das demais curvas analíticas utilizadas nesse trabalho (em $CaCl_2$ 0,01M, na matriz e a curva extraída) foram preparadas no mínimo cinco concentrações diferentes.

Os passos detalhados para os testes de Jacknife e Levene e o método dos mínimos quadrados ponderados na regressão linear, encontram-se a seguir:

1) Determinação dos coeficientes angular, linear e de determinação.

2) Com os valores obtidos dos coeficientes angular e linear, calculou-se a concentração teórica e plotou-se o gráfico de resíduos em função da concentração.

3) Verificação dos pontos anômalos pelo teste de Jacknife (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Este teste utiliza uma estimativa do desvio padrão independente de cada ponto da calibração, seguindo as Equações 1, 2 e 3.

$$R_i = \frac{e_i}{Se_i} \qquad \text{(Equação 1)}$$

$$Se_i = s_{res}\sqrt{1 - h_i} \qquad \text{(Equação 2)}$$

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{x_i - x_{med}}{S_{xx}} \qquad \text{(Equação 3)}$$

Onde: x_i é a concentração de cada nível, x_{med} é a média das concentrações, S_{xx} é a variância das concentrações, s_{res} é o desvio dos resíduos e e_i são os resíduos (área encontrada – área prevista).

Com um intervalo de confiança de 95%, e n-p-1 graus de liberdade (onde n é o número de níveis de concentração e p é o número de parâmetros modais, nesse caso 2 – coeficiente angular e linear) encontrou-se o valor limite para os R_i, chamado $t_{crítico}$. Se o R_i de um determinado nível de concentração for superior ao $T_{crítico}$, este ponto é considerado anômalo e removido do grupo de dados. Após esta remoção, os coeficientes foram calculados novamente e o teste Jacknife recalculado para o novo grau de liberdade.

A verificação da homocedasticidade dos resíduos foi promovida pelo teste de Levene (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Neste teste encontrou-se o T_L, descrito pelas equações 4, 5 e 6.

$$T_l = \frac{d_{1\,med} - d_{2\,med}}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}\right) sp^2}} \qquad \text{(Equação 4)}$$

$$d_{j\,médio} = \sum \frac{\left|e_{j\,mediana} - e_{ij}\right|}{n_j} \qquad \text{(Equação 5)}$$

$$sp^2 = \frac{SSD_1 + SSD_2}{n_1 + n_2 - 2} \qquad \text{(Equação 6)}$$

1) Primeiramente os resíduos são divididos em dois grupos, seguindo a ordem crescente de concentração. Para cada grupo, encontrou-se a mediana ($e_{j\ mediana}$) e a média das diferenças entre a mediana e os resíduos, $d_{j\ médio}$.

2) Para o cálculo da variância agrupada (sp^2) utilizou-se a soma dos desvios quadrados de cada grupo (SDD).

→ Quando o teste estatístico não ultrapassa o valor crítico calculado com t a 95% de confiança e n_1+n_2-2 graus de liberdade, pode-se considerar que há homocedasticidade nos resíduos e, portanto pode-se utilizar a regressão determinada.

→ Quando a suposição de homocedasticidade não é cumprida pelos dados analíticos, uma maneira simples e eficaz para neutralizar a maior influência das concentrações maiores na linha de regressão é utilizar o método dos mínimos quadrados ponderados na regressão linear, conforme descrito por Almeida, Castel-Branco e Falcão (2002) e sumarizado a seguir:

a) Encontram-se os coeficientes angular e linear de cada fator de ponderação (wi) $1/x^{0,5}$; $1/x$; $1/x^2$, $1/y^{0,5}$, $1/y$, $1/y^2$ por meio das equações 7 e 8:

$$coef\ ang = \frac{\sum w_i.\sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i.\sum w_i y_i}{\sum w_i.\sum w_i xi^2 - (\sum w_i x_i)^2} \qquad \text{(Equação 7)}$$

$$coef\ linear = \frac{\sum w_i xi^2.\sum w_i y_i - \sum w_i x_i.\sum w_i x_i y_i}{\sum w_i.\sum w_i xi^2 - (\sum w_i x_i)^2} \qquad \text{(Equação 8)}$$

b) Calcula-se para cada fator a porcentagem de erro relativo, plota-se o gráfico da %RE em função da concentração e calcula-se a somatória dos erros relativos (Equação 9).

$$\%RE = \frac{Conc_{calculada} - Conc_{experimental}}{Conc_{experimental}} \qquad \text{(Equação 9)}$$

c) Para o fator de ponderação cujo gráfico apresentar a melhor distribuição dos erros e a menor somatória dos mesmos, realiza-se os testes para exclusão dos pontos anômalos e de homocedasticidade descritos anteriormente. Caso os dados apresentem heterocedasticidade, escolhe-se um novo fator e realizam-se novamente os testes, até encontrar o fator que apresente homocedasticidade.

4.5.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) instrumental

O limite de detecção do equipamento foi determinado conforme descrito pelo INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010, para sete replicatas da injeção do branco do método (solvente), seguindo a fórmula (Equação 10), para um nível de confiança de 95% e n-1 graus de liberdade:

$$\mathbf{LD} = \mathbf{X_{média}} + \mathbf{t_{(n-1,\ 1-\alpha)}} \cdot \mathbf{s} \qquad \text{(Equação 10)}$$

Onde: $X_{média}$ é a média dos valores dos brancos da amostra; t é a distribuição de Student e S é o desvio padrão amostral dos brancos da amostra.

Para a determinação do limite de quantificação, o INMETRO recomenda que seja adotado o menor nível da curva analítica (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010).

4.6 Obtenção, tratamento e caracterização dos solos

Para a escolha dos locais de coleta, foram utilizados os seguintes critérios:

1) Escolheu-se uma cultura que poderia ser contaminada pelas duas micotoxinas em estudo (AFB1 e ZEA);
2) Escolheu-se diferentes Estados que produzem em grande quantidade a cultura selecionada.

Para garantir que os solos estudados fossem o mais próximo possível dos solos possivelmente contaminados pelas micotoxinas AFB1 e ZEA, foi realizado,

primeiramente, um levantamento para escolher uma cultura com provável contaminação pelas micotoxinas escolhidas. A Tabela 6 sumariza as principais culturas afetadas por AFB1 e ZEA no Brasil.

Tabela 6 - Principais culturas contaminadas por AFB1 e ZEA.

Substância	Principal espécie de fungo produtor	Culturas com maior potencial de contaminação no Brasil
Aflatoxina B1	*Aspergillus*	Amendoim, milho amêndoas de castanha-do-brasil e de caju
Zearalenona	*Fusarium*	Milho, trigo e arroz

Fonte: Santos, Lopes, Kosseki, 2001, Amaral et al., 2006, Freire, Kozakiewicz, Paterson, 2000, Freire et al., 2007.

Como pode ser observado na Tabela 6, o milho, no Brasil pode apresentar contaminação tanto da AFB1, quanto da ZEA. Além disso, outro fator importante é a produção elevada desta cultura no país, uma vez que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial deste grão (BRASIL, 2016), onde os principais produtores são Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (BRASIL, 2016).

Foram selecionadas três localidades, uma de cada Estado fortemente produtor, (SP, MG e PR) sendo que as amostras foram coletadas em áreas não agrícolas (solo não contaminado pelas micotoxinas) das cidades de Araraquara (SP), Corbélia (PR) e Lavras (MG), a uma profundidade máxima de 20 centímetros. Para a realização deste trabalho, foram realizadas duas amostragens (em cada um dos locais). A primeira amostragem, realizada em 2014, foi utilizada para os testes preliminares dos estudos de sorção e, portanto, foram tratadas e caracterizadas conforme descrito no Teste 106 do Guia da Organisation for Economic Co-Operation and Develompent - OECD (2000). Uma segunda amostragem foi realizada em 2015, onde após a coleta, as amostras de solo foram homogeneizadas e separadas em dois grupos, que seguiram para dois tratamentos diferentes, descritos a seguir, de acordo com os testes a serem realizados posteriormente:

Tratamento 1: para os estudos de sorção e dessorção, o tratamento e caracterização das amostras de solo foi realizado conforme descrito no Teste 106 do Guia da OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND

DEVELOPMENT, 2000). As amostras foram secas à temperatura ambiente com posterior desagregação suave, para não alterar significativamente a textura original do solo. O solo foi peneirado em peneira com abertura de 2mm e homogeneizado. Estas amostras já tratadas foram armazenadas em frascos de alumínio e mantidos à temperatura ambiente. Uma alíquota de cada solo foi enviada ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) para caracterização química e física.

Tratamento 2: Para os estudos de degradação, o tratamento e caracterização das amostras de solo foi realizado conforme descrito no Teste 307 do Guia da Organisation for Economic Co-Operation and Develompent (2002). As amostras foram coletadas e processadas o mais rápido possível. O solo foi peneirado em peneira com abertura de 2mm e homogeneizado. As amostras foram mantidas sob refrigeração (temperatura entre 2 e 6°C) por um período de, no máximo, três meses, a fim de manter a atividade microbiana. Uma alíquota de cada amostra foi enviada ao Laboratório de microbiologia do solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz De Queiroz" para análise da biomassa microbiana.

As amostras provenientes da segunda amostragem também foram submetidas à testes de determinação da umidade (tratamento 1 e 2) e determinação da capacidade de campo (tratamento 2).

4.6.1 Determinação da umidade e capacidade de campo das amostras de solo

A umidade das amostras de solo foi determinada conforme descrito no Manual de Métodos de Análise de Solos (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1997). Foram pesados 3 gramas de solo em cadinhos de porcelana (tarados) e deixados em uma estufa (105-110 °C) por 24 horas. A secagem na estufa foi repetida até obtenção da massa constante da amostra resfriada à temperatura ambiente em um dessecador.

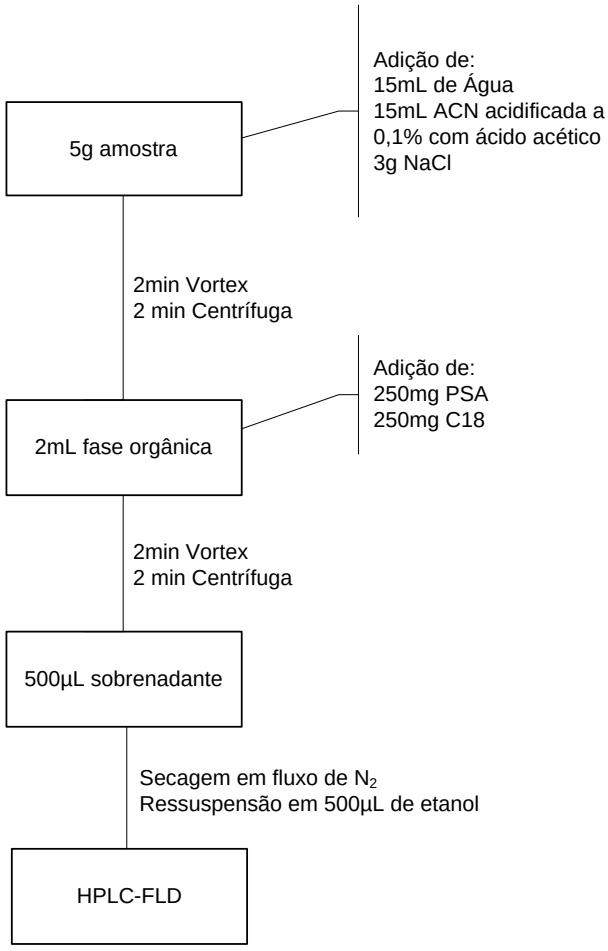
A capacidade de campo é definida pelo teor de água que um solo retém contra a ação da gravidade, após ser plenamente saturado e deixado drenar livremente por um período de tempo (em média, de 1 a 3 dias) (VEIHMEYER; HENDRICKSON, 1931 apud CASAROLI; JONG VAN LIER, 2008). O teste foi realizado em colunas de vidro com 1cm de diâmetro interno, contendo 10 g de solo. Nas colunas foram adicionados 10 mL de água deionizada, e os eluatos foram recolhidos em uma proveta, até o completo escoamento. A capacidade de campo

das amostras de solo foi considerada como a diferença entre o volume inicial adicionado e o recolhido na proveta (LUCHESE; FAVERO; LENZI, 2001).

4.7 Método de extração para análise de micotoxinas em solo

O método desenvolvido neste trabalho para a extração dos analitos (Figura 6) consiste basicamente em uma extração/partição com acetonitrila, na presença de água e NaCl, seguida de uma extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com C18 e amina primária e secundária (PSA).

Figura 6: Método QuEChERS desenvolvido para extração de AFB1 e ZEA de solo.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.8 Validação do método de extração

A validação do método de extração foi realizada com o solo de Araraquara, onde foram avaliados os seguintes critérios: seletividade, precisão e exatidão, estudo do efeito matriz, limite de detecção e limite de quantificação.

4.8.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foi realizada a extração com o solo coletado de uma região não agrícola (sem micotoxinas). Onde foi avaliada a possível presença de interferentes que poderiam co-eluir com os analitos.

4.8.2 Efeito Matriz

O efeito matriz é um parâmetro extremamente importante na avaliação do método, mas dentre as principais fontes de referência para realização da validação do método (EURACHEM, INMETRO e IUPAC) apenas a IUPAC cita a avaliação do efeito matriz, mas não especifica como deve ser realizada (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Neste trabalho, este parâmetro foi avaliado comparando-se as curvas analíticas preparadas no solvente (etanol), no extrato da matriz (onde o extrato, após secagem, foi redissolvido em uma solução contento os analitos em concentração conhecida) e uma terceira curva, chamada de extraída (o solo, após fortificação com cinco concentrações diferentes dos analitos, em mistura, passa pelo processo de extração) para avaliar a diferença entre os coeficientes angulares das curvas (Equação 11).

$$\%\ Efeito\ matriz = \frac{X1-X2}{X2} \times 100 \qquad \text{(Equação 11)}$$

Onde:
- X1: coeficiente angular da curva analítica preparada na matriz
- X2: coeficiente angular da curva analítica preparada em solvente

4.8.3 Precisão e exatidão

Os ensaios de recuperação foram utilizados para avaliar a precisão e a exatidão do método. A recuperação do analito pode ser estimada com a análise de

amostras fortificadas com os analitos em três níveis diferentes de concentrações conhecidas. Já a exatidão foi demonstrada pelo coeficiente de variação destes estudos.

Para realizar o estudo de recuperação as amostras de solo foram pesadas e fortificadas com solução padrão mista dos analitos nas concentrações 0,045 µg g^{-1} (1º nível), 0,300 µg g^{-1} (2º nível), 2,250 µg g^{-1} (3º nível). Para cada nível foram realizados três replicatas. O tempo de contato entre a matriz e o analito foi de quatro horas. Após este período a extração foi realizada conforme descrito no fluxograma da Figura 6.

4.8.4 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção foi determinado conforme descrito pelo INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (2010), a partir da injeção de extratos do branco do método (extração do solo sem o analito), conforme descrito na Equação 10. Já para a determinação do limite de quantificação, o mesmo documento recomenda adotar o LQ como a menor concentração na qual o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão, ou seja, na menor concentração que apresentou porcentagem de recuperação entre 70 a 120% com coeficiente de variação menor que 20%.

4.9 Estudo de degradação/persistência

Em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 40cm^3 de capacidade, são adicionados 5g de solo (massa seca) e quantidade de água suficiente para atingir 60% da capacidade de campo. Para que este valor de umidade seja mantido durante o experimento, uma vez por semana, os frascos foram pesados, e ajustados, adicionando-se água suficiente para retornar ao teor de água inicial. Os recipientes foram vedados com papel alumínio (com pequenos orifícios para entrada de ar) e incubados a 25ºC (escolhida por apresentar os valores de temperatura média dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná), e na ausência de luz. Após um período de pré-incubação de 5 dias, as amostras foram fortificadas para uma concentração de 1,70µg g^{-1} para AFB1 e 2,25µg g^{-1} para ZEA e incubadas novamente. Após intervalos de tempo apropriados (0; 3; 7; 12; 20; 28; 60; 90 e 125 dias), realizou-se o processo de extração (Figura 6) nas amostras, para verificar a

concentração das micotoxinas remanescente no solo. O experimento foi realizado para as micotoxinas, em mistura, nos três tipos de solo. Para cada intervalo de tempo, foram avaliados os três solos, em duplicata, e também realizada a extração de um branco (para cada tipo de solo), totalizando 81 frascos, 9 para cada intervalo de tempo.

Cálculos envolvidos

Existem diversos modelos matemáticos para explicar a degradação de uma substância (principalmente os pesticidas) em solo. Para este estudo optou-se por testar dois modelos:

- ✓ Modelo cinético de primeira ordem (GUSTAFSON; HOLDEN, 1990)

$$lnC_t = lnC_0 - Kt \qquad \text{(Equação 12)}$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{ln2}{K} \qquad \text{(Equação 13)}$$

$$DT_{90} = \frac{ln10}{K} \qquad \text{(Equação 14)}$$

Onde: C_t é a concentração (µg g^{-1}) em cada tempo; t é o tempo (dias); C_0 é a concentração inicial (µg g^{-1}); K é o coeficiente angular da curva (dia^{-1}); $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida (dias) e DT_{90} é o tempo (dias) para o desaparecimento de 90% da substância.

- ✓ Modelo não linear de Gustafson-Holden (GUSTAFSON; HOLDEN, 1990).

$$C_t = C_0(1 + \beta t)^{\alpha} \qquad \text{(Equação 15)}$$

$$DT_{50} = \frac{1}{\beta}\left[2^{\left(\frac{1}{\alpha}\right)} - 1\right] \qquad \text{(Equação 16)}$$

$$DT_{90} = \frac{1}{\beta}\left[10^{\left(\frac{1}{\alpha}\right)} - 1\right] \qquad \text{(Equação 17)}$$

Onde: C_t é a concentração (µg g^{-1}) em cada tempo; t é o tempo (dias); C_0 é a concentração inicial (µg g^{-1}); α e β são parâmetros da distribuição Gamma; DT_{50} é o tempo (dias) para o desaparecimento de 50% da substância, e DT_{90} é o tempo (dias) para o desaparecimento de 90% da substância.

4.10 Estudo de sorção e dessorção

O ensaio delineado para avaliar a sorção e a dessorção de uma substância em diferentes tipos de solo é constituído por três fases, conforme descrito no Teste 106 do Guia OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000)

1) estudos preliminares
2) cinética de sorção e de dessorção
3) isotermas de sorção e de dessorção

Princípio do método sorção

Concentrações conhecidas das micotoxinas em solução de $CaCl_2$ 0,01M são adicionadas a amostras de solo, com peso seco conhecido, as quais foram pré-equilibradas em solução de $CaCl_2$ 0,01M (por 12 horas). Utiliza-se a solução de cloreto de cálcio 0,010 mol L^{-1}, para minimizar a troca catiônica nos estudos de sorção em solos (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000). A mistura é agitada durante um tempo apropriado, e com temperatura constante de 25ºC (escolhida por apresentar os valores de temperatura média dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná). Em seguida, as suspensões do solo são separadas por centrifugação ou decantação, filtradas e a fase aquosa é analisada. A quantidade de substância adsorvida pela amostra de solo é calculada como a diferença entre o valor inicialmente presente na solução e a quantidade remanescente no final do experimento.

Cálculos envolvidos

A partir do estudo de sorção, obtêm-se os valores de porcentagem de sorção (A, % - Equação 18) e do coeficiente de distribuição (K_d, cm^3 g^{-1}) para cada uma das substâncias, nos diferentes tipos de solo (Equação 19).

$$A = \frac{m_s^{ads} \times 100}{m_0} \ (\%) \qquad \text{(Equação 18)}$$

$$C_s^{ads} = K_d \times C_{aq}^{ads} \qquad \text{(Equação 19)}$$

Onde: m_s^{ads} é a massa da micotoxina presente no solo (equilíbrio, µg); m_0 é a massa da micotoxina adicionada no início do experimento (µg); C_s^{ads} é a concentração da micotoxina no solo (equilíbrio, µg g^{-1}) e C_{aq}^{ads} é a concentração da micotoxina no meio aquoso (equilíbrio, µg cm^{-3}).

Princípio do método de dessorção

Após o término do experimento de sorção, a mistura é centrifugada e a fase aquosa é removida ao máximo. O volume retirado é medido, e adiciona-se um volume igual de $CaCl_2$ 0,01M. A nova mistura é agitada até atingir o equilíbrio da dessorção. A cada intervalo de tempo, as suspensões do solo são separadas por centrifugação ou decantação, filtradas e a fase aquosa é analisada. Ao experimento, a cada alíquota da fase aquosa que é retirada para análise, adiciona-se o mesmo volume de solução $CaCl_2$ 0,01M, para manter o volume de solução constante.

Cálculos envolvidos

A partir do estudo de dessorção, obtêm-se os valores de porcentagem de dessorção (D, % - Equação 20) definida como a porcentagem de micotoxina que é dessorvida, comparada com a quantidade de substância que foi sorvida no ensaio de sorção. Também é possível calcular o coeficiente de dessorção aparente (K_{des}, cm^3 g^{-1} – Equação 21).

$$D = \frac{m_{aq}^{des} \times 100}{m_s^{ads}} \ (\%) \qquad \text{(Equação 20)}$$

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads} - m_{aq}^{des}}{m_{aq}^{des}} \frac{V_T}{m_{solo}} \qquad \text{(Equação 21)}$$

Onde: m_s^{ads} é a massa da micotoxina presente no solo (equilíbrio, µg); m_{aq}^{des} é a massa da micotoxina dessorvida durante o experimento (µg); V_T é o volume total da

fase aquosa em contato com o solo, durante o experimento (cm^3) e m_{solo} é a massa de solo utilizada no experimento.

Todas as etapas do estudo de sorção e dessorção são realizadas em solução de $CaCl_2$ 0,01M, o que justifica a necessidade dos próximos dois experimentos (escolha do filtro de seringa e avaliação da resposta cromatográfica).

4.10.1 Escolha do filtro de seringa

Para a execução deste experimento, foi preparada uma solução mista dos padrões nas concentrações 150 µg L^{-1} para AFB1 e 600µg L^{-1} para ZEA em $CaCl_2$ 0,01M (meio no qual são realizados os experimentos de sorção/dessorção e degradação). Esta solução foi então homogeneizada e retiradas cinco alíquotas para cada um dos seguintes tratamentos, que foram posteriormente analisados por CLAE-FLU.

- Tratamento 1: sem filtração
- Tratamento 2: Filtro de Difluoreto de polivinilideno (PVDF)
- Tratamento 3: Filtro de Politetrafluoroetileno *(*PTFE)
- Tratamento 4: Filtro de Nylon (Poliamida – PA)
- Tratamento 5: Filtro de Celulose Regenerada (CR)

4.10.2 Avaliação da resposta cromatográfica em solução de $CaCl_2$ 0,01M

Foram preparadas soluções mistas dos analitos, em 10 concentrações diferentes, em etanol e em $CaCl_2$ 0,01M. As áreas obtidas foram utilizadas para a elaboração das curvas analíticas, conforme descrito no ítem 4.5.2.

O cálculo para avaliar a diferença entre os coeficientes angulares das curvas foi efetuado utilizando a Equação 11.

4.10.3 Estudos preliminares

4.10.3.1 Razão solo/solução, estabilidade do analito e tempo de equilíbrio

Esta etapa do estudo foi realizada para encontrar a razão adequada de solo/solução. Neste trabalho optou-se por testar primeiramente a proporção de 25cm^3 de solução $CaCl_2$ 0,01M para 5g solo, razão 5/1 – valor intermediário das proporções sugeridas no Teste 106 do Guia OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000).

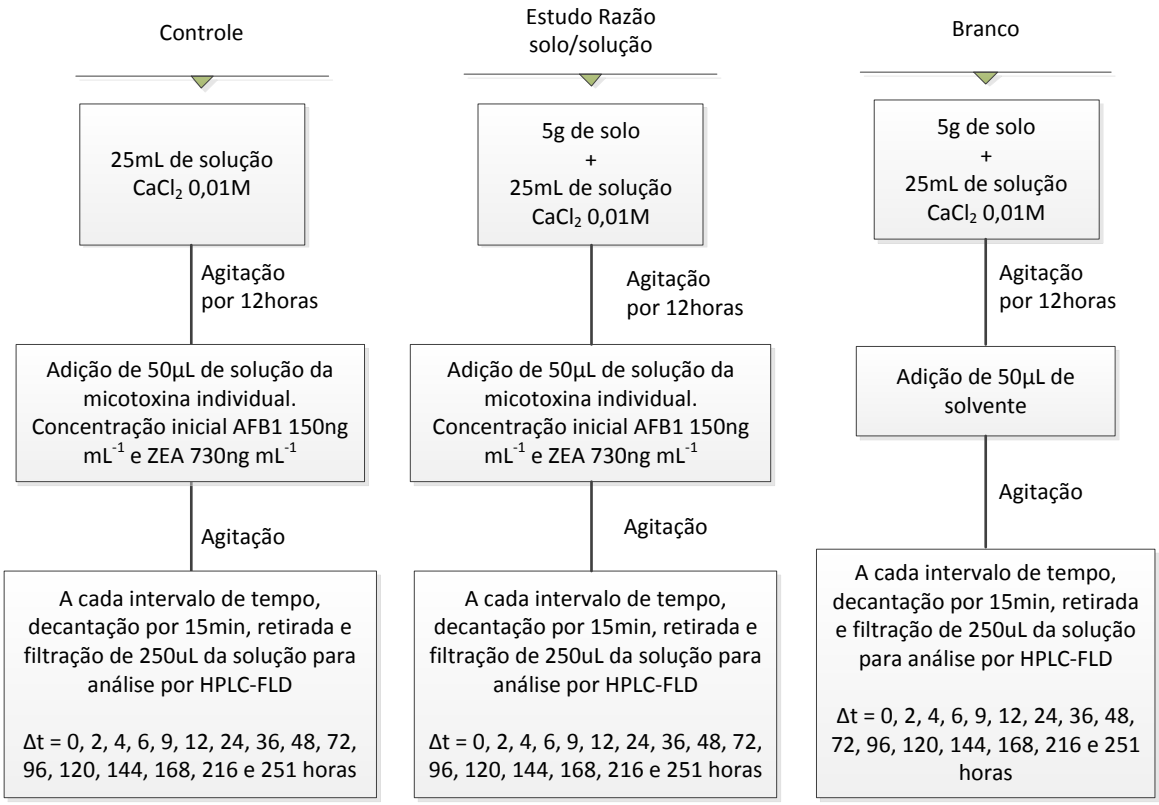
No experimento de sorção, descrito em detalhes, na Figura 7, foram incluídos três grupos:

- ✓ Branco = solo + solução $CaCl_2$ 0,01M (sem o analito)
- ✓ Controle = Solução $CaCl_2$ 0,01M + analito (sem o solo)
- ✓ Estudo = Solo + Solução $CaCl_2$ 0,01M + Analito

Totalizando três brancos (um para cada tipo de solo), dois controles (um para cada analito) e seis estudos (3 tipos de solo para cada um dos analitos), todos realizados em duplicata (22 ensaios, no total).

O experimento também foi utilizado para a determinação do tempo de equilíbrio, ou seja, o tempo no qual o sistema atinge um patamar, e não há mais variação na concentração de analitos no solo, e na solução. O equilíbrio pode ser determinado em um gráfico da porcentagem de sorção em função do tempo (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000).

Figura 7 – Fluxograma do experimento para determinação da razão solo/solução, da estabilidade do analito e do tempo de equilíbrio.



Fonte: elaborada pelo autor.

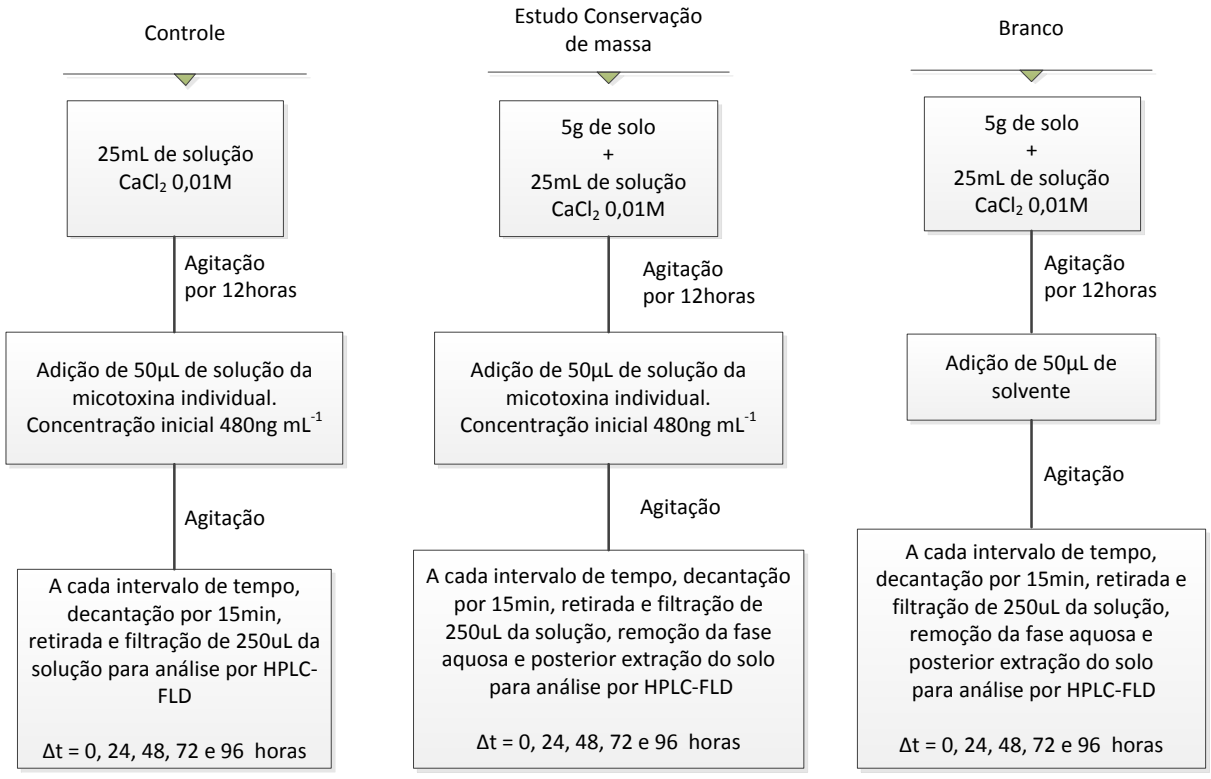
4.10.3.2 Estudo de conservação de massa

Para a realização deste teste, escolheu-se apenas o solo de Lavras, por ser o que apresentou degradação mais rápida para as duas micotoxinas. O teste foi realizado com as micotoxinas separadamente, para evitar que haja competição microbiológica na degradação das substâncias.

O estudo é basicamente igual ao estudo de sorção/dessorção realizado no ítem anterior, porém, a cada intervalo de tempo, analisa-se a fase aquosa, e também o solo, por meio do processo de extração (Figura 6). A concentração inicial das micotoxinas no experimento (meio aquoso) foi de 480ng mL^{-1} (equivalente a 1440 ng g^{-1} de solo, para uma sorção de 100%).

Para quantificação dos analitos na fase aquosa foi utilizada uma curva preparada em $CaCl_2$ 0,01M e para quantificação no solo foi utilizada uma curva extraída. O experimento (realizado em um solo, com as micotoxinas individualmente) contou com 5 leituras, em duplicata (20 frascos) mais um branco para cada leitura e três controles para cada analito, totalizando 31 frascos.

Figura 8 – Fluxograma do experimento de conservação de massa.



Fonte: elaborado pelo autor.

Cálculos envolvidos

Para verificar se houve conservação de massa, realizou-se uma comparação entre a soma das massas (fase aquosa e solo) e as massas encontradas no grupo controle, em cada leitura, utilizando o Teste t de Student (Equações 22 e 23) (HARRIS, 2012).

$$S_{agrupado} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1)+s_2^2(n_2-1)}{n_1+n_2-2}} \qquad \text{(Equação 22)}$$

$$t_{calculado} = \frac{|x_1-x_2|}{S_{agrupado}}\sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1+n_2}} \qquad \text{(Equação 23)}$$

Onde: n_1 é o número de medidas do grupo 1; n_2 é o número de medidas do grupo 2; x_1 é a média dos valores do grupo1 e x_2 é a média dos valores do grupo 2.

O valor de $t_{calculado}$ é comparado ao valor de $t_{tabelado}$ para n_1+n_2-2 graus de liberdade e 95% de confiança. Se $t_{calculado} < t_{tabelado}(95\%)$, a diferença não é significativa, e portanto, considera-se que houve conservação das massas. Caso o valor de $t_{calculado} > t_{tabelado}(95\%)$ assume-se que não houve conservação da massa a partir deste período.

4.11 Cinética de sorção e de dessorção

Os estudos de cinética foram realizados para os três solos, com as micotoxinas em mistura e individualmente, conforme descrito no fluxograma da Figura 9. Nesse experimento, assim como nos anteriores, também foram realizados o Branco e o Controle

- ✓ Branco = solo + solução $CaCl_2$ 0,01M (sem o analito)
- ✓ Controle = Solução $CaCl_2$ 0,01M + analito (sem o solo)

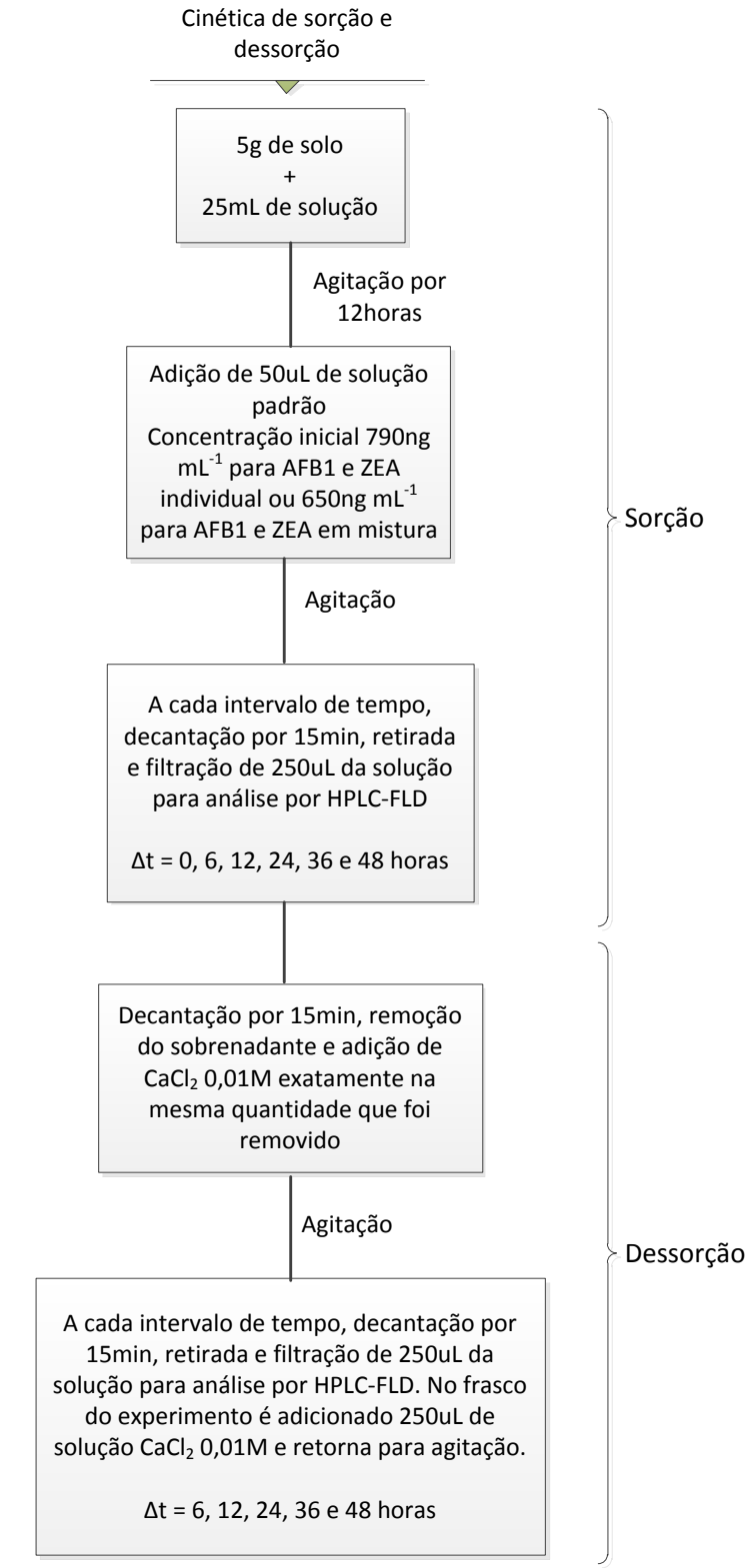
Totalizando três brancos (um para cada tipo de solo), quatro controles (dois para cada analito) e dezoito experimentos (3 tipos de solo para cada um dos analitos em mistura e individual, realizados em duplicata).

Cálculos envolvidos

A porcentagem de sorção, A (Equação 18) é calculada a cada leitura e representada graficamente em função do tempo. No equilíbrio, calcula-se o coeficiente de distribuição, K_d (Equação 19).

Para a cinética de dessorção, calcula-se a porcentagem de dessorção (Equação 20) a cada tempo, que também é representada graficamente, em função do tempo. No equilíbrio, calcula-se o coeficiente de dessorção, K_{des} (Equação 21).

Figura 9 – Fluxograma do experimento para determinação da cinética de sorção e de dessorção.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.12 Isotermas de sorção e de dessorção

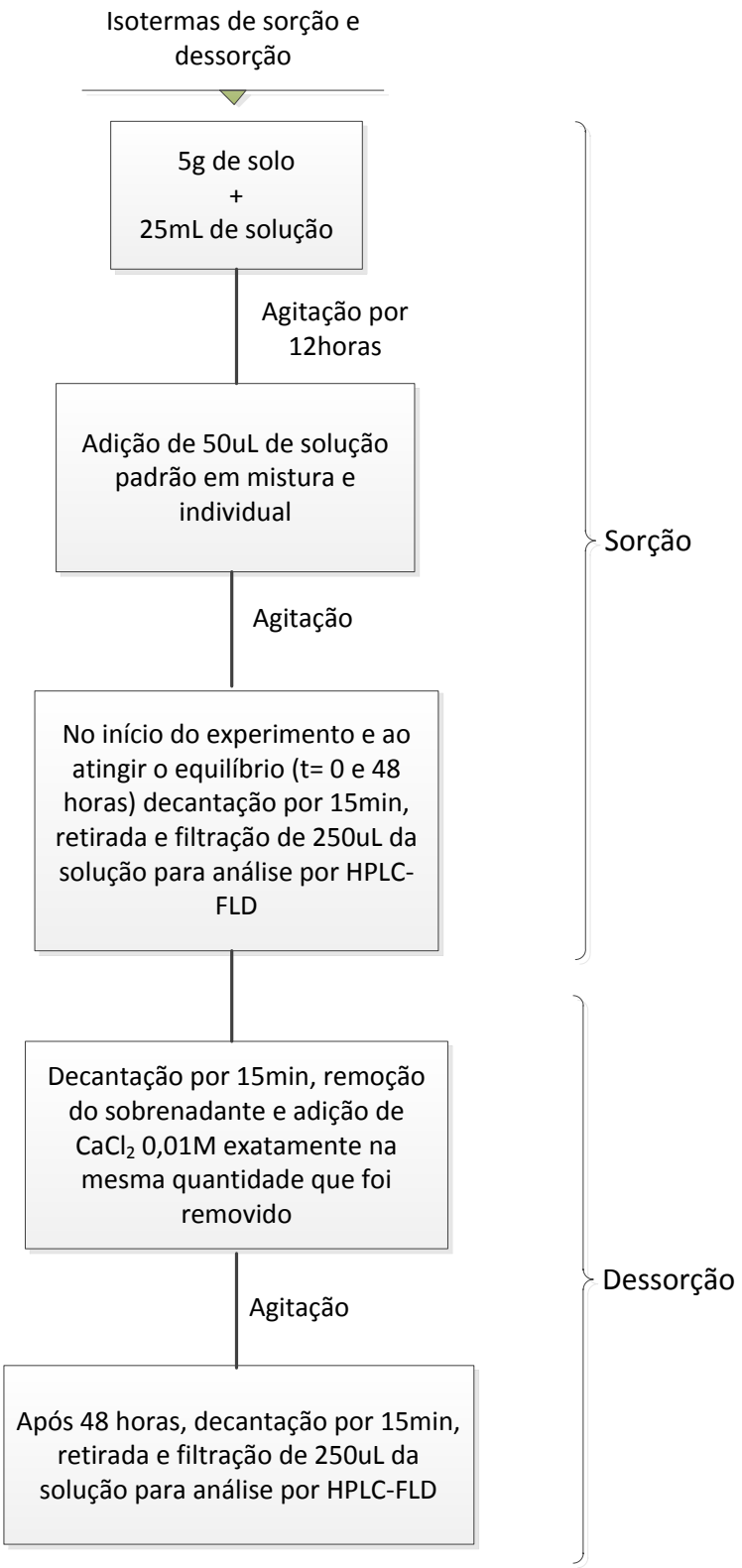
O ensaio é realizado de forma semelhante ao de cinética, porém são escolhidas cinco concentrações das micotoxinas, de forma individual e em mistura (Tabela 7), onde a fase aquosa é analisada apenas no início e ao atingir o equilíbrio (Figura10). Assim como nos estudos anteriores, também foram realizados o branco para cada solo e o controle com um nível de concentração intermediário (C_3)

Tabela 7 - Concentrações utilizadas para o estudo das isotermas em mistura e individual.

Níveis	**Mistura (ng mL^{-1})**		**Individual (ng mL^{-1})**	
	AFB1	**ZEA**	**AFB1**	**ZEA**
C1	110	100	130	75
C2	350	260	400	210
C3	600	460	730	330
C4	860	700	960	560
C5	970	740	1290	700

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 10 – Fluxograma do experimento para determinação das isotermas de sorção e dessorção



Fonte: elaborada pelo autor

Cálculos envolvidos

As concentrações das micotoxinas na fase aquosa (equilíbrio) são determinadas, e a massa sorvida, por unidade de massa de solo é plotada como uma função da concentração de equilíbrio na fase aquosa.

Existem diversos modelos matemáticos frequentemente utilizados para descrever o comportamento do processo de sorção de uma substância em solo. Para este estudo optou-se por testar três modelos: Linear, Langmuir e Freundlich, por serem frequentemente encontrados na literatura para descrever a adsorção de compostos orgânicos em (HUANG et al., 2003; OSAGIE; OWABOR, 2015; VASSILIS et al., 2016).

O modelo linear de primeira ordem sugere um aumento linear da sorção com o aumento da concentração (GILES; SMITH; HUITSON, 1974) enquanto o modelo de Langmuir sugere que a adsorção ocorre homogêneamente, em sítios específicos, sem interação com a molécula do analito, se tornando máxima quando uma camada monomolecular cobre totalmente a superfície do adsorvente. Já o modelo de Freundlich sugere que a energia de adsorção decresce logaritmicamente à medida que a superfície vai sendo coberta pelo soluto, pois considera-se a heterogeneidade da superfície do adsorvente, o que a diferencia do modelo de Langmuir.

- ✓ Modelo linear

$$Q = K_d \times C \qquad \text{(Equação 24)}$$

$$K_{OC} = K_d \frac{100}{\%_{OC}} \qquad \text{(Equação 25)}$$

Onde: Q é a concentração no solo (μg g^{-1}), C é a concentração na solução (μg cm^{-3}), K_d é o coeficiente de sorção linear (cm^3 g^{-1}) e K_{oc} é o coeficiente de distribuição normalizado ao carbono orgânico e $\%_{OC}$ é a porcentagem de carbono orgânico no solo.

- ✓ Modelo de Langmuir

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_0} + \frac{1}{bQ_0C} \qquad \text{(Equação 26)}$$

Para este modelo, encontra-se também o fator de separação (R_L) (Webber and Chakkravorti, 1974 apud Vassilis 2016).

$$R_L = \frac{1}{1+bC_0} \qquad \text{(Equação 27)}$$

Onde: Q é a concentração no solo (µg g^{-1}), e C é a concentração na solução (µg cm^{-3}), Q_0 é a adsorção máxima (µg g^{-1}), b é a constante de Langmuir (cm^3 g^{-1}) e C_0 é a concentração inicial da micotoxina (µg cm^{-3}).

Quanto menor o valor de R_L, mais favorável é o processo de sorção. R_L>1 indica que o processo de sorção não é favorecido; para valores 0<R_L<1 o processo é favorecido; R_L=1 e R_L=0 indica que a sorção é linear e irreversível, respectivamente (VASSILIS et al., 2016).

- ✓ Modelo de Freundlich

$$logQ = logK_F + \left(\frac{1}{n}\right) logC \qquad \text{(Equação 28)}$$

Onde: K_F é a constante de Freundlich ((µg g^{-1}) (cm^3 g^{-1})$^{1/n}$) e n é uma grandeza adimensional, relacionada ao formato da isoterma.

4.13 Avaliação da mobilidade das micotoxinas

Existe na literatura diversos modelos de avaliação de contaminação das águas subterrâneas e superficiais, principalmente para pesticidas (LOURENCETTI et al., 2005) os quais são calculados empregando-se as características físico-químicas e propriedades de sorção e persistência ambiental desses compostos. Dentre estes modelos, destacam-se o método do Diretório de Segurança de Pesticidas do Reino Unido, DSPRU (BOXAL et al., 2013), que classifica a mobilidade de pesticidas em águas superficiais, o método de GOSS, o qual apresenta o potencial de transporte de uma molécula associada ao sedimento ou dissolvida em água e o método de GUS que indica o potencial de lixiviação (PESSOA et al., 2004). Importante ressaltar que, embora esses métodos tenham sido criados para pesticidas, pode-se encontrar na literatura, trabalhos que utilizaram estes modelos para diferentes contaminantes (TANG et al., 2012; BOXAL et al., 2013).

✓ Modelo do Diretório de Segurança de Pesticidas do Reino Unido (DSPRU): Classifica a mobilidade dos compostos em águas superficiais, utilizando os valores de K_{oc}, conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Critérios de mobilidade de acordo com o Diretório de Segurança de Pesticidas do Reino Unido (DSPRU).

Mobilidade	**K_{OC} (cm^3 g^{-1})**
Muito móvel	< 15
Móvel	15 – 74
Moderadamente móvel	75 – 499
Ligeiramente móvel	500 – 4000
Baixa mobilidade	> 4000

Fonte: adaptado de Boxal et al., 2013.

✓ Índice de GOSS: Desenvolvido para avaliar o potencial de contaminação de águas superficiais, por pesticidas, utiliza o tempo de meia vida no solo, o coeficiente de sorção normalizado ao teor de carbono orgânico do solo, e a solubilidade em água (GOSS, 1992; PESSOA et al., 2004). Possui dois métodos de classificação:

1) Classificação do potencial de transporte da substância associada ao sedimento:

a) Alto potencial:

t½ solo ≥ 40 dias e K_{oc} ≥ 1000 mL $g^{-}1$ ou

t½ solo ≥40 dias e K_{oc} ≥ 500 mL g^{-1} e solubilidade em água ≤ 0,5 µg mL^{-1}

b) Baixo potencial:

t½ solo ≤ 1dia; ou

t½ solo ≤ 2 dias e K_{oc} ≤ 500 mL.g^{-1}; ou

t½ solo ≤ 4 dias e K_{oc} ≤ 900 mL g^{-1} e solubilidade em água ≥ 0,5 µg mL^{-1} ou

t½ solo ≤ 40 dias e K_{oc} ≤ 500 mL g^{-1} e solubilidade em água ≥ 0,5 µg mL^{-1}; ou

t½ solo ≤ 40 dias e K_{oc} ≤ 900 mL g^{-1} e solubilidade em água ≥ 2,0 µg mL^{-1}

c) Médio Potencial:

Caso não atenda nenhuma das exigências para ser classificado como alto ou baixo potencial.

2) Classificação do potencial de transporte da substância dissolvida em água.

a) Alto potencial:

t½ solo > 35 dias e K_{oc} < 100.000 mL g^{-1} e solubilidade ≥ 1 µg mL^{-1} ou

Koc ≤ 700 mL g^{-1} e 10≤solubilidade≤100 µg mL^{-1}

b) Baixo potencial:

K_{oc} ≥ 100.000 mL g^{-1} ou

t½ solo ≤ 1dia e K_{oc} ≥ 1.000 mL g^{-1} ou

t½ solo < 35 dias e solubilidade < 0,5 µg mL^{-1}

c) Médio Potencial:

Caso não atenda nenhuma das exigências para ser classificado como alto ou baixo potencial.

✓ Índice de GUS (Groundwater Ubiquity Score): Utiliza o tempo de meia-vida no solo e o coeficiente de sorção normalizado ao teor de carbono orgânico do solo. Neste método, o contaminante é classificado de acordo com seu potencial de lixiviação, sendo assim, muito utilizado para avaliar a contaminação de águas subterrâneas (GUSTAFSON, 1989) A equação para a estimativa deste índice está apresentada na Equação 29.

$$GUS = (logt_{\frac{1}{2}}) \times (4 - logK_{OC}) \qquad \text{(Equação 29)}$$

O valor de GUS obtido é utilizado para classificar a substância em uma das categorias, definidas por faixas pré-estabelecidas, conforme os seguintes intervalos:

a) GUS ≤ 1,8 - não sofre lixiviação;

b) 1,8 < GUS < 2,8 - faixa de transição;

c) GUS ≥ 2,8 - Provável Lixiviação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, utilizou-se como base o trabalho de Rahman e Jinap (2010), que propuseram um método para determinação de micotoxinas (três diferentes classes, incluindo os analitos deste estudo) em cereais, por CLAE-FLU.

Foram realizadas algumas alterações nas condições cromatográficas, incluindo a redução no volume de injeção (de 100 para 20 µL), por não ser compatível com o volume comumente utilizado no equipamento em uso. A segunda modificação encontra-se no tamanho das partículas da coluna (3,5 µm no método original). A utilização de partículas menores que 5,0 µm acarreta em um aumento na pressão do sistema, inviabilizando seu uso. Também foram modificados os comprimentos de onda de excitação e emissão dos analitos, pois optou-se por remover a etapa de derivatização, por envolver o consumo de mais reagente para promover a reação e também por se apresentar como uma fonte de possíveis erros. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados para a AFB1 foram 365nm e 425nm, respectivamente, conforme descrito na literatura (SIRHAN; TAN; WONG, 2011) e 275nm e 450nm para a ZEA (JOANNIS-CASSAN et al., 2011).

A partir do método de Rahman e Jinap (2010), o qual apresentava três componentes na fase móvel - água acidificada com 0,1% de ácido acético (HOAc), acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) e eluição gradiente, foi possível desenvolver um método ternário e isocrático para a separação dos analitos (Figura 11A).

Na segunda etapa do desenvolvimento cromatográfico, estabeleceu-se um método binário, utilizando ácido acético 0,1% e acetonitrila, na proporção encontrada para os solventes orgânicos do primeiro teste (Figura 11B).

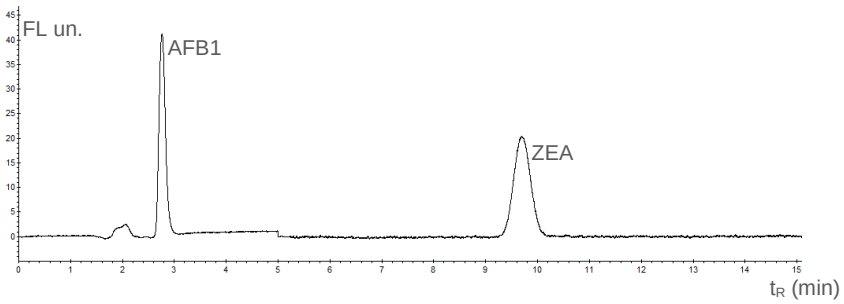
Como os trabalhos da literatura para determinação de micotoxinas por CLAE apresentam, em sua maioria, métodos com metanol, um solvente de menor impacto, tanto ambiental quanto para a saúde do analista, quando comparado à acetonitrila, optou-se por realizar um novo teste de fase binária com o metanol (Figura 11C). Para o ajuste da porcentagem do solvente, utilizou-se uma régua de força de eluição (nomógrafo), onde pode-se trocar uma mistura com 45:55 (V:V, H_2O:ACN) em 30:70 (V:V, H_2O:MeOH), conforme apresentado na Figura 12.

Considerando-se tanto a questão da exposição do analista, quanto na geração de resíduos, optou-se por seguir os preceitos da Química verde e testar um

solvente de menor impacto que o metanol, o etanol (EtOH). A princípio foram testadas as mesmas condições do método apresentado para a mistura ácido acético 0,1%:metanol, mas não houve uma boa separação dos analitos. A partir deste primeiro teste, foram realizados testes sucessivos, modificando a composição da fase móvel e temperatura do forno, até obter a melhor separação e simetria dos picos (Figura 11D).

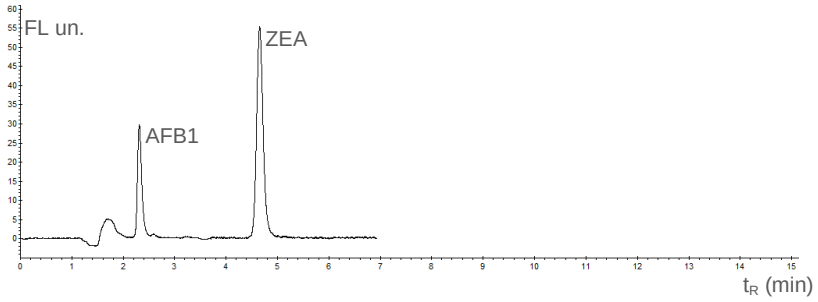
Figura 11 - Desenvolvimento do método cromatográfico para análise de AFB1 e ZEA por CLAE-FLU.

A)



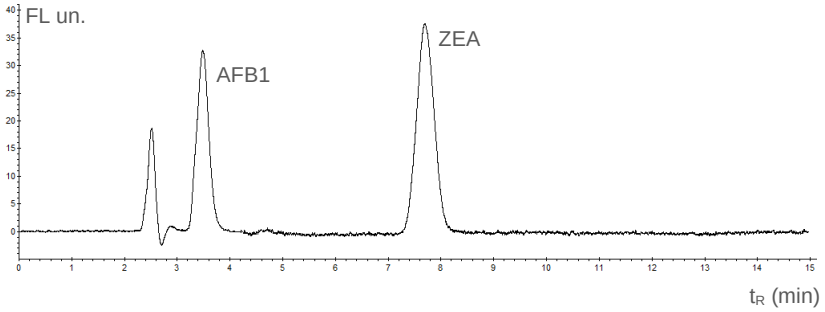
Fase móvel
Isocrática 0 a 15 min
45% HOAC 0,1%
30% ACN
25% MeOH
Temperatura do forno: 40ºC

B)



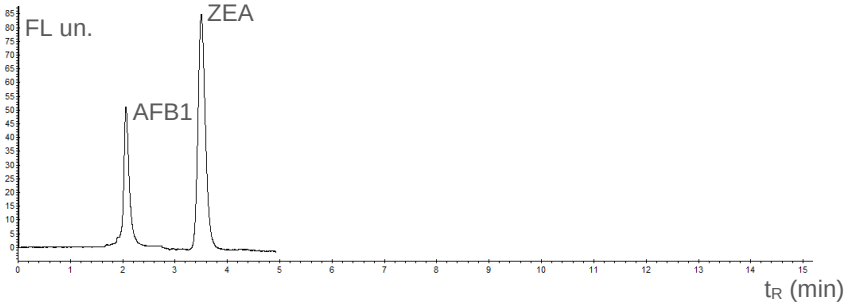
Fase móvel
Isocrática 0 a 7 min
45% HOAC 0,1%
55% ACN
Temperatura do forno: 40ºC

C)



Fase móvel
Isocrática 0 a 12 min
30% HOAC 0,1%
70% MeOH
Temperatura do forno: 40ºC

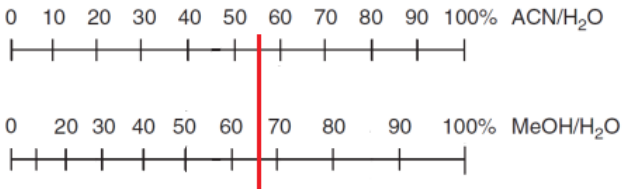
D)



Fase móvel
Isocrática 0 a 1 min – 45% HOAC 0,1%; 55% EtOH
Gradiente 1 a 2 min – 30% HOAC 0,1%; 70% EtOH
Isocrática 2 a 5 min – 30% HOAC 0,1%; 70% EtOH
Temperatura do forno: 50ºC

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 12 - Nomógrafo: régua de força de eluição, destacado em vermelho a mudança de uma composição 45:55 (H_2O: ACN) em aproximadamente 30:70 (H_2O: MeOH)



Fonte: Adaptado de Snyder; Kirkland e Dolan (2010).

É importante ressaltar, que a fase estacionária utilizada (C18 – Gemini, Phenomenex) foi do tipo end-capped para prevenir o encaudamento dos picos, uma vez que as micotoxinas apresentam grupos polares, principalmente a ZEA, que possui hidroxilas. Também para minimizar o encaudamento, utilizou-se fase móvel acidificada (0,1% HOAc), para manter os analitos (ZEA) e os silanóis residuais da coluna na forma protonada, impedindo também, uma interação irreversível.

5.1.1 Comparação entre as condições cromatográficas

A fim de comparar os métodos com diferentes fases móveis, os dados de assimetria (As), resolução (Rs) e seletividade (Selet), obtidos pelo *software* Galaxie estão expostos na Tabela 9, juntamente com os valores de tempo de retenção (t_R), área e coeficiente de variação (CV). As fórmulas das equações para o cálculo da assimetria (Equação 30), resolução (Equação 31) e seletividade (Equação 32) estão apresentadas a seguir.

$$As = \frac{W_{5\%}}{2f} \qquad \text{(Equação 30)}$$

Onde $W_{5\%}$ é a largura do pico na base a 5% da altura e f representa a primeira metade da largura do pico na base a 5% da altura.

$$Rs = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \qquad \text{(Equação 31)}$$

Onde: t_{R1} and t_{R2} representam o tempo de retenção do primeiro pico e do segundo pico, respectivamente. E W_1 e W_2 representam a largura dos respectivos picos.

$$Selet = \frac{t_{R2} - T_0}{T_0 - t_{R1}} \qquad \text{(Equação 32)}$$

Onde: T_0, t_{R1}, t_{R2} representam, respectivamente, o tempo morto, o tempo de retenção do primeiro pico e o tempo de retenção do segundo pico.

Tabela 9 - Comparação entre os diferentes métodos cromatográficos (n=6)

Método	Analito	t_R (min)	CV %	Área *	CV %	As	Rs	Selet	Tempo total da análise (min)
ACN	AFB1	2,32	0,4	166	7	1,41	12,61	2,01	7
	ZEA	4,66	0,2	479	1	1,19			
MeOH	AFB1	3,42	2	515	3	1,06	8,30	2,21	10
	ZEA	7,58	2	863	2	1,07			
EtOH	AFB1	2,06	0,4	315	1	1,30	6,90	1,69	5
	ZEA	3,49	0,2	832	1	1,23			

* Unidades de fluorescênciaXsegundos; Legenda: As = assimetria; CV = coeficiente de variação; Rs = resolução; Selet = seletividade; t_R = tempo de retenção
Fonte: elaborada pelo autor

Considerando-se o tempo de retenção, não houve variação significativa na precisão com a troca das condições de eluição, podendo-se observar que o CV foi menor do que 2% para todas as composições de FM, sendo que a composta por MeOH apresentou o maior CV, provavelmente por causa da maior viscosidade da mistura MeOH:H_2O.

Quanto ao tempo total da corrida, a FM composta por etanol apresenta o menor valor, porém, como a eluição é gradiente, diferentemente dos demais métodos, há a necessidade de um tempo de estabilização maior entre as corridas, e portanto, a análise com a fase móvel composta por ACN é a mais rápida, seguida pela que contém etanol e por último o metanol.

A resolução indica a eficiência com que dois picos são separados, assim como a seletividade. Nota-se que o método com maior resolução cromatográfica é o que utiliza acetonitrila, enquanto que o método com metanol possui melhor seletividade. Já o fator de assimetria indica a simetria dos picos, onde valores próximos de 1 apresentam picos mais simétricos. Nesse sentido, o método com metanol apresentou os melhores resultados.

A resposta do detector de fluorescência foi melhor com a FM composta por MeOH, seguida pela FM com EtOH para os dois analitos, sendo mais notável este

efeito para a AFB1 do que para ZEA. Esta diferença de detectabilidade já era esperada em cromatografia líquida com detecção de fluorescência, uma vez que a intensidade de emissão dos analitos depende totalmente do meio em que se encontram os mesmos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Com relação aos coeficientes de variação das áreas, nota-se que os melhores resultados foram obtidos com a fase móvel contendo etanol.

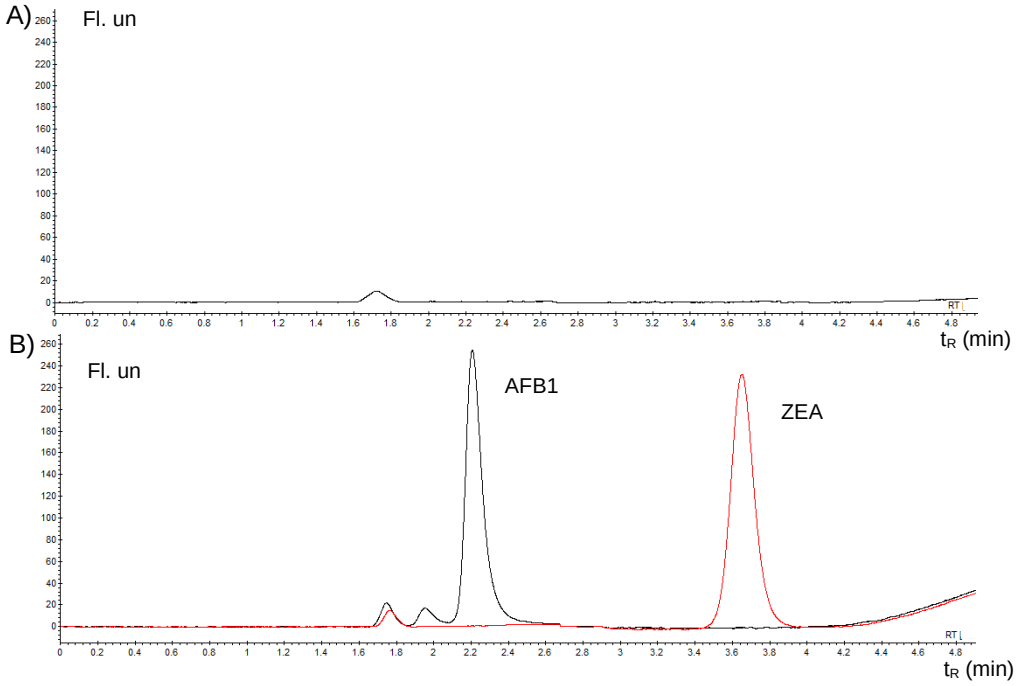
No geral, observa-se que cada método se destacou em um parâmetro, mas os três apresentaram uma boa separação entre os analitos e também uma boa simetria dos picos. Com o intuito de colaborar com a diminuição da geração de resíduos tóxicos, além de garantir a segurança do analista, optou-se por utilizar o método com etanol para prosseguir os estudos.

5.2 Validação do método cromatográfico

A seletividade do método pode ser observada comparando-se os cromatogramas apresentados na Figura 13, onde a Figura 13A mostra que não há presença de interferentes co-eluindo com os analitos, presentes na Figura 13B.

Quanto à identificação das micotoxinas, realizada com a injeção de soluções padrões dos analitos, individualmente, pode ser confirmada com os cromatogramas presentes na Figura 13B, que apresenta em preto, o cromatograma obtido com uma solução padrão da AFB1, enquanto em vermelho observa-se o cromatograma de uma solução de ZEA.

Figura 13 - Cromatograma (CLAE-FLU) obtido nas condições da Tabela 5: (A) etanol (B) Solução padrão dos analitos AFB1 (preto, 50 µg L^{-1}) e ZEA (vermelho, 50µg L^{-1}), em etanol.



Fonte: elaborada pelo autor

A precisão do método, tanto na identificação (t_R), quanto na quantificação (área) dos analitos é comprovada pelos dados apresentados na Tabela 10 (para n=3), o qual apresentou CV de no máximo 0,5% no tempo de retenção dos analitos e de no máximo 4% na área dos mesmos, indicando assim uma boa precisão do método.

Tabela 10 - Valores médios e coeficiente de variação do tempo de retenção e da área dos analitos, indicando a precisão do método (n=3).

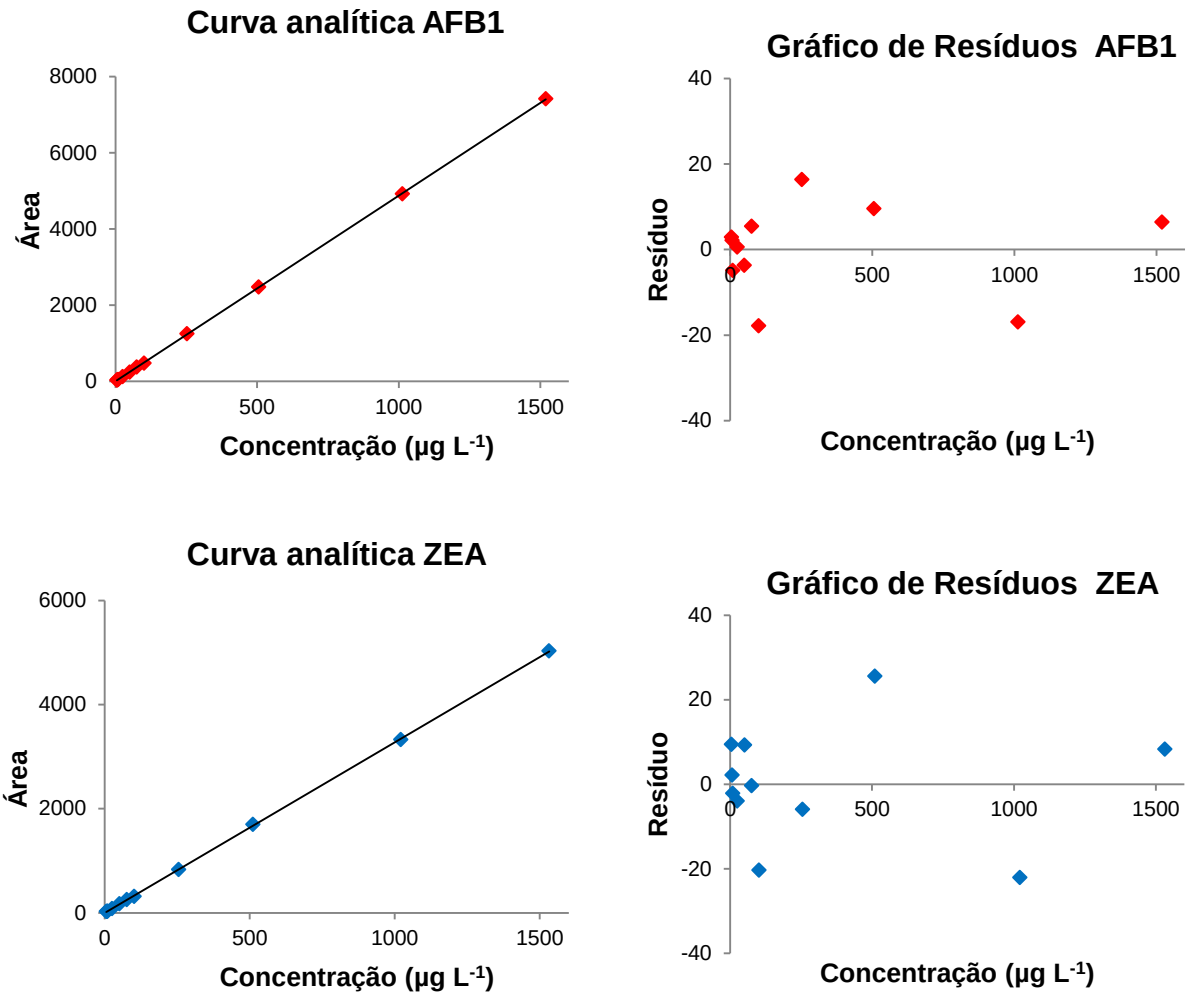
Concentração aproximada (µg L^{-1})	AFB1				ZEA			
	t_R		Área*		t_R		Área*	
	Média (min)	CV (%)	Média *	CV (%)	Média (min)	CV (%)	Média *	CV (%)
5	2,04	0,2	30	3	3,21	0,3	26	2
8	2,05	0,2	41	2	3,22	0,5	27	2
10	2,05	0,2	47	3	3,19	0,3	31	3
25	2,05	0,2	126	1	3,23	0,4	80	4
50	2,05	0,2	245	1	3,22	0,3	177	4
75	2,04	0,2	378	1	3,22	0,4	251	3
100	2,04	0,2	478	0,4	3,21	0,4	314	2
255	2,05	0,1	1232	1	3,22	0,1	832	0,1
510	2,05	0,1	2506	1	3,22	0,1	1774	1
1015	2,04	0,4	4947	1	3,21	0,4	3327	1
1525	2,04	0,4	7397	0,3	3,21	0,3	5032	0,1

* Unidades de FluorescênciaXsegundos
Fonte: elaborada pelo autor.

Para o estudo de linearidade e a determinação do intervalo de trabalho foram preparadas soluções com uma mistura dos analitos em 13 concentrações, em etanol, compatíveis com os valores necessários para a realização dos estudos de mobilidade. E a média das áreas obtidas para cada concentração, de cada um dos analitos, foi utilizada para realizar os cálculos descritos no ítem 4.5.2.

Na Figura 14 e Tabela 11 encontram-se os gráficos e os valores obtidos para o estudo de linearidade de cada analito, respectivamente.

Figura 14 - Curvas analíticas e Gráficos de Resíduos para AFB1 e ZEA em etanol.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 11 - Parâmetros da curva analítica para AFB1 e ZEA em etanol.

Micotoxina	Coef Angular	Coef Linear	R^2	Número de pontos anômalos	Teste de homocedasticidade	Faixa linear de trabalho
AFB1	4,873	2,237	0,999	2 (2,5 e 1250 µg L^{-1})	t_{calc} = -1,94 t_{crit} = 2,26	5 a 1500µg L^{-1}
ZEA	3,278	-0,169	0,999	2 (2,5 e 1250 µg L^{-1})	t_{calc} = -2,25 t_{crit} = 2,26	5 a 1500µg L^{-1}

Fonte: elaborada pelo autor

De acordo com os valores para o $t_{calculado}$ no teste de homocedasticidade (t_L) e os valores de $t_{crítico}$, pode-se confirmar, juntamente com os gráficos de resíduos apresentados na Figura 14 que os resíduos apresentam homogeneidade na variância, e portanto, a regressão linear utilizada é válida, sem a necessidade de realizar a regressão linear ponderada. Para as duas micotoxinas estudadas a faixa linear de trabalho varia de 5 a 1500µg L^{-1}.

O limite de detecção e o limite de quantificação instrumentais, calculados conforme apresentado no ítem 4.8.4 estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) instrumentais

Micotoxina	**LD (µg L^{-1})**	**LQ (µg L^{-1})**
AFB1	0,36	5,0
ZEA	0,68	5,0

Fonte: elaborada pelo autor.

Para as duas micotoxinas, foram obtidos um amplo intervalo linear de trabalho (Tabela 11), juntamente com baixos valores de LQ (Tabela 12), essas características do método instrumental são indispensáveis para os próximos estudos, que avaliam a mobilidade e persistência dessas micotoxinas em solo.

5.3 Caracterização dos solos

Na Tabela 13 encontram-se os resultados obtidos das análises Físicas e Químicas dos solos de Araraquara (SP), Corbélia (PR) e Lavras (MG) nas duas coletas. É importante ressaltar que as amostras da primeira coleta foram utilizadas para os estudos prévios (exceto o de conservação de massa), e as amostras da segunda coleta foram utilizadas para os estudos de degradação, conservação de massa, cinética e isoterma.

Tabela 13 - Resultados das análises das amostras de solo inseridas neste trabalho (efetuadas no Instituto Agronômico de Campinas)

Parâmetros	Araraquara		Corbélia		Lavras	
	Coleta 1	**Coleta 2**	**Coleta 1**	**Coleta 2**	**Coleta 1**	**Coleta 2**
Argila (%)	51,2	63,7	61,2	72,3	53,8	64,3
Silte (%)	28,0	18,6	30,8	20,7	26,9	18,4
Areia Total (%)	20,8	17,7	8.0	7,0	19,3	17,3
Densidade de Partícula (g/cm^3)	-	2,88	-	2,67	-	2,58
Matéria orgânica (MO) (g/dm^3)	31	19	48	59	49	46
Matéria orgânica (MO) Calculada* (%)	-	0,66	-	2,21	-	1,78
Carbono Orgânico Calculado** (%)		2,61	-	0,78	-	0,97
Acidez Ativa (pH em CaCl2 0,01M)	4,8	5,5	3,9	4,5	6,4	6,2
Fósforo (P) (mg/dm^3)	3	7	10	20	18	23
Potássio (K) ($mmolc/dm^3$)	0,5	0,8	1,3	2.5	2,6	2,8
Cálcio (Ca) ($mmolc/dm^3$)	11	9	19	47	95	97
Magnésio (Mg) ($mmolc/dm^3$)	7	3	2	16	9	16
Capacidade de troca de cátions (C.T.C) - ($mmolc/dm^3$)	60,5	32,8	141,3	145,5	122,6	133,8
Nitrogênio (N) - (g/kg)	1,2	0,6	3,9	2,7	1,9	1,7

* Calculada com base nos valores de densidade de partícula e matéria orgânica (g/cm^3)
** Calculado com base nos valores de matéria orgânica %OM/%OC = 1,724 (VASSILIS et al., 2016)
Fonte: elaborada pelo autor.

Dentre os parâmetros analisados, destacam-se a matéria orgânica, a acidez ativa, além da composição textural, que são os que mais podem interferir no processo de sorção e degradação (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000).

De acordo com o protocolo para o cultivo de milho da EMBRAPA, os solos mais recomendados para a cultura do milho são os de textura média (com teores de argila em torno de 30-35%) ou os argilosos, pois apresentam boa capacidade de retenção de água e de nutrientes disponíveis para as plantas. Por outro lado, solos arenosos devem ser evitados, devido à sua baixa capacidade de retenção de água e

nutrientes disponíveis para as plantas, geralmente apresentam intensa lixiviação e perdem mais água por evaporação, sendo, normalmente, mais secos (LANDAU; SANS; SANTANA, 2009).

Portanto, as amostras de solo coletadas nas diferentes localidades possuem as características compatíveis com os solos mais adequados ao plantio de milho, e a escolha dos três locais de coleta é coerente com os objetivos do estudo, para os experimentos de mobilidade e persistência.

Quanto às características microbiológicas, o resultado das análises da biomassa microbiana das amostras (da segunda coleta) obtidas a partir do segundo tratamento (que foram utilizadas para o estudo de degradação), estão expostas na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da análise da biomassa microbiana das amostras de solo inseridas neste trabalho (tratamento 2) realizadas pelo Laboratório de microbiologia do solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz De Queiroz"

Local de amostragem	**Biomassa microbiana (mg C g^{-1} de solo seco)**
Araraquara	0,54
Corbélia	1,00
Lavras	0,91

Fonte: elaborada pelo autor.

As determinações do carbono da biomassa microbiana do solo são importantes para avaliação do tamanho do reservatório mais ativo e dinâmico da matéria orgânica do solo, uma vez que a biomassa microbiana é considerada a parte viva e mais ativa da matéria orgânica, constituída basicamente por fungos e bactérias que atuam em processos que vão desde a formação do solo até a decomposição de resíduos orgânicos (REIS JUNIOR; MENDES, 2007). A biomassa microbiana representa cerca de 2 a 5% do carbono orgânico do solo (JENKINSON; POWLSON, 1976).

Apenas como fator de comparação, encontrou-se na literatura o trabalho de D'Andréa et al. (2002) onde são estudados, no Brasil, diversos sistemas de manejo, como pastagens, o cerrado e diferentes tipos de plantios, incluindo as culturas de milho. Nesse estudo, os maiores valores de carbono da biomassa microbiana foram

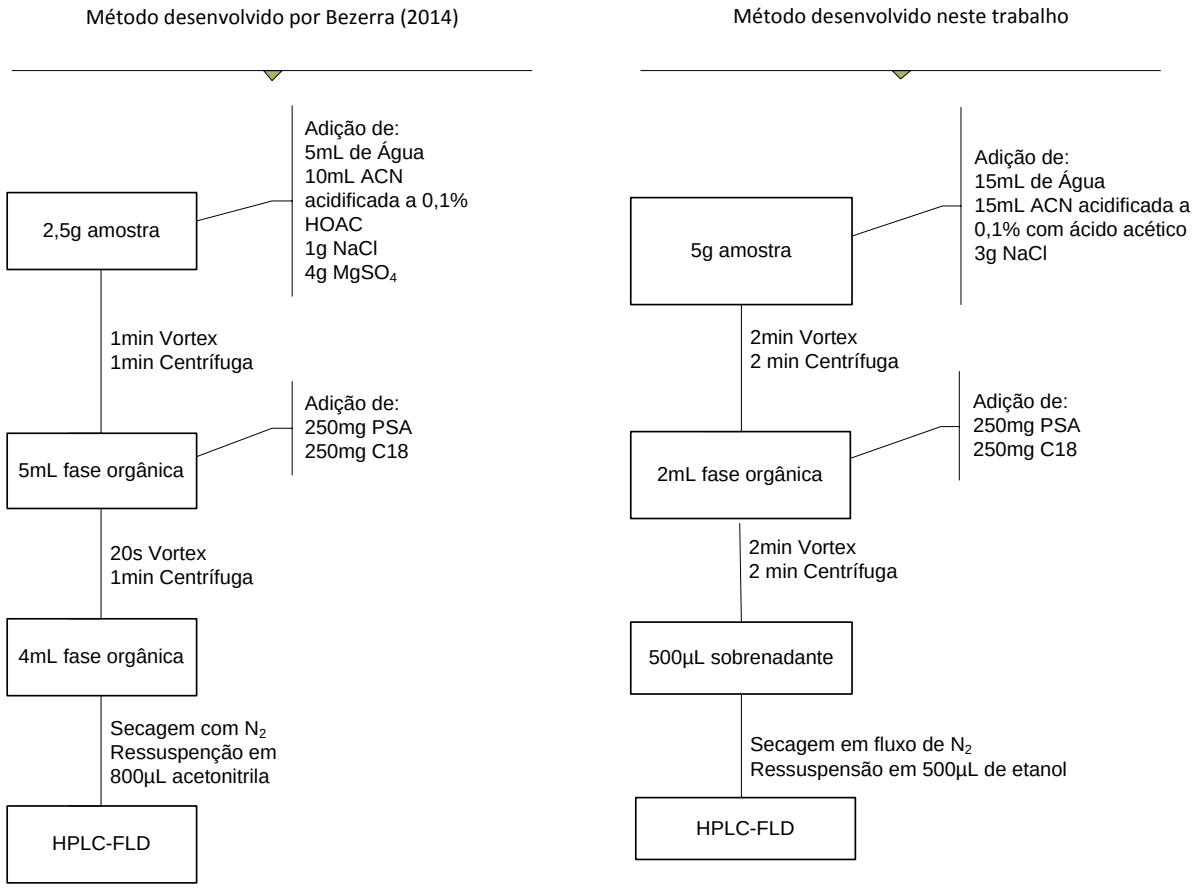
encontrados nas camadas superficiais, onde são mais intensos os processos de transformação da matéria orgânica pelos microrganismos do solo, e apresentaram valores de 1,31 mg g^{-1} no Cerrado, 0,67 mg g^{-1} na pastagem de braquiária e de 0,21 mg g^{-1} em área cultivada com milho.

Como pode ser observado, os valores encontrados nas amostras dos solos (Tabela 14) são compatíveis com os valores citados no trabalho de D'Andréa et al. (2002), porém, muito acima dos valores obtidos para as áreas cultivadas, indicando uma elevada atividade microbiana.

5.4 Método de extração

O método desenvolvido neste trabalho para a extração dos analitos é uma modificação do método QuEChERS (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003) baseado, principalmente, no trabalho desenvolvido para extração de hormônios em sedimento (BEZERRA, 2014). A Figura 15 apresenta o método de Bezerra (2014) juntamente com o método desenvolvido neste trabalho.

Figura 15 - Comparação do método de Bezerra (2014) com o método desenvolvido



Fonte: elaborada pelo autor.

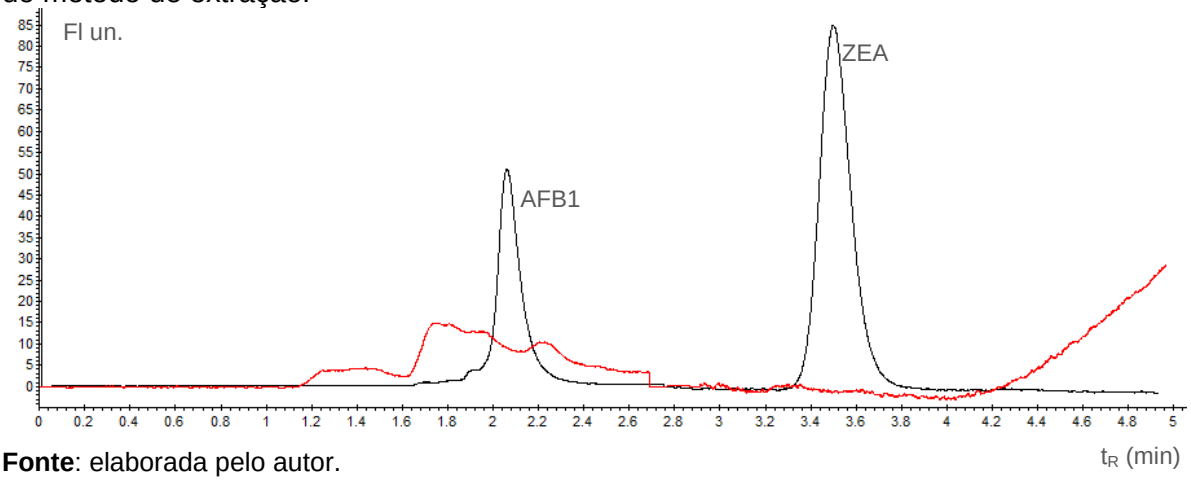
Dentre as principais diferenças entre os métodos, destacam-se a massa de amostra, que passou de 2,5 para 5,0 gramas, por ser a massa de solo utilizada nos estudos de degradação e também a massa escolhida para primeiro teste de razão solo/solução para os estudos de sorção. Com o aumento da massa utilizada, foi necessário aumentar o volume de solvente extrator (ACN) e de água. Nesse método, optou-se por não utilizar o $MgSO_4$ anidro, uma vez que ao ser hidratado, sua cristalização acaba dificultando o contato entre o solvente de extração e a matriz. Como o $MgSO_4$ anidro também favorece a partição das fases, foi necessário aumentar a massa de NaCl. Também foi reduzido o volume da fase orgânica utilizada no processo de clean-up e removida a etapa de concentração dos analitos ao final do processo. As mudanças foram necessárias para evitar o aumento da linha de base e o aparecimento de interferentes, assim como os possíveis danos causados ao equipamento (CLAE-FLU).

5.5 Validação do método

5.5.1 Seletividade e Efeito Matriz

A seletividade do método de extração foi avaliada realizando-se uma extração com a matriz (solo de Araraquara), sem a presença dos analitos, chamada de branco do método. A Figura 16 apresenta a sobreposição do cromatograma de uma solução padrão (em vermelho) comparada com o branco do método (preto).

Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas da solução padrão (em preto - AFB1 50µg L^{-1} e ZEA 250µg L^{-1}) comparada com o branco do método (vermelho) para avaliar a seletividade do método de extração.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nota-se que o branco do método apresenta uma elevação na linha de base, principalmente entre os tempos de retenção 1,8 e 2,6 min, onde tem-se a eluição da AFB1. Uma análise mais cautelosa dos efeitos deste aumento na linha de base será observada no estudo do efeito matriz, realizado conforme descrito no ítem 4.8.2, cujos resultados estão expostos na Tabela 15 e representados nas curvas da Figura 17. Para este estudo, foram realizadas três curvas analíticas:

- ✓ curva em etanol (solvente) com sete concentrações diferentes de soluções mistas dos analitos;
- ✓ curva no extrato da matriz, onde realiza-se o processo de extração, conforme descrito no fluxograma da Figura 6, em um solo não contaminado (branco do método), e após a secagem com fluxo de N_2, a ressuspensão é realizada em

uma solução mista dos analitos (em etanol). Esse processo foi realizado para sete concentrações diferentes.

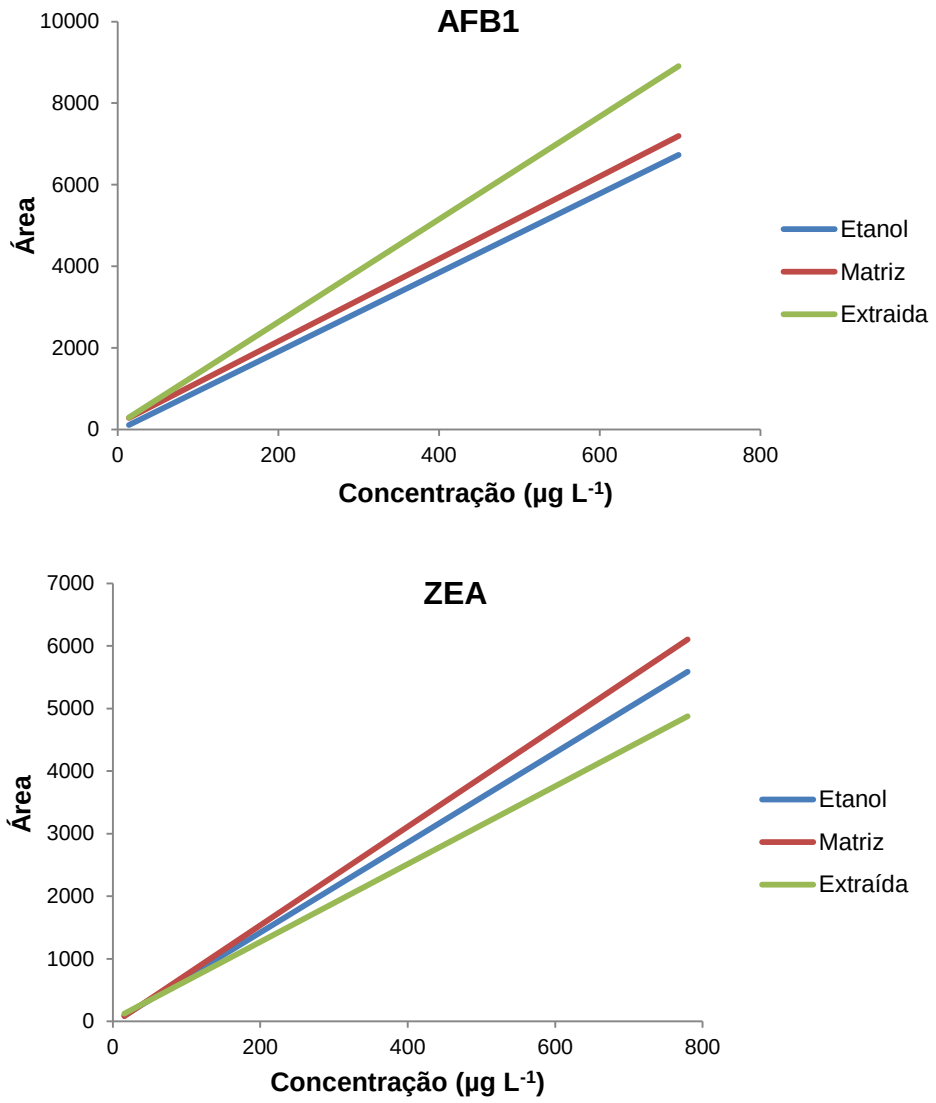
- ✓ curva extraída, onde o solo é fortificado com uma solução mista dos analitos por 4 horas, e após este período realiza-se a extração. Para esta curva, as amostras de solo foram fortificadas com cinco concentrações distintas.

Tabela 15 - Comparação entre as curvas analíticas das micotoxinas em etanol, no extrato da matriz e a curva extraída.

Analito	Curva	Coef Angular	Coef Linear	R^2	Número de pontos anômalos removidos	Teste de homocedas-ticidade	Ponde-rado	% Efeito Matriz
AFB1	Etanol	9,68	-24,73	0,999	0	T_{calc} = 0,78 T_{crit} = 2,57	não	-
	Extrato da Matriz	10,10	142,36	0,999	0	T_{calc} = -1,46 T_{crit} = 2,57	não	4*
	Extraída	12,58	119,20	0,999	0	T_{calc} = -2,29 T_{crit} =3,18	não	25**
ZEA	Etanol	7,19	-17,51	0,999	0	T_{calc} = 0,02 T_{crit} = 2,57	não	-
	Extrato da Matriz	7,88	-39,83	0,999	0	T_{calc} = -0.73 T_{crit} = 2,57	não	10*
	Extraída	6,21	26,98	0,998	0	T_{calc} = -0,01 T_{crit} =3,18	não	-21**

*comparação dos coeficientes angulares com as curvas em etanol;
** comparação dos coeficientes angulares com as curvas preparadas no extrato da matriz.
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 17 - Curvas analíticas em etanol, no extrato da matriz e extraída para AFB1 e ZEA.



Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser observado pela Figura 17 e pelos dados da Tabela 15, não houve efeito matriz pronunciado (>10%) ao comparar as curvas em solvente e no extrato da matriz, para os dois analitos. Porém, nota-se uma grande diferença nos coeficientes lineares, principalmente para a AFB1, provavelmente, devido ao aumento na linha de base observado na Figura 16. Para evitar os erros causados pela presença da matriz na resposta cromatográfica, optou-se por quantificar os valores obtidos, no estudo de recuperação com a curva preparada no extrato da matriz.

Já para a curva extraída, que foi comparada com a curva na matriz, observou-se um efeito matriz superior a 20%, e também uma diferença entre os coeficientes lineares para as duas micotoxinas. Ao compararmos os gráficos das curvas notamos que para a AFB1 tanto a curva extraída quando a curva na matriz têm efeito positivo na resposta, sendo que, na curva extraída este efeito é maior. Já para a ZEA os efeitos são antagônicos, a curva extraída tem efeito negativo na resposta, enquanto que a curva na matriz tem efeito positivo. Maiores interpretações para essas observações estão expostas no ítem 5.5.2, após apresentação dos resultados do estudo de recuperação.

5.5.2 Estudo de recuperação e Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) do método

Conforme descrito no ítem 4.8.3, o estudo de recuperação foi realizado para avaliar a precisão e a exatidão do método. Os valores encontrados foram interpolados nas curvas analíticas preparadas no extrato da matriz, e com as concentrações obtidas pode-se encontrar o valor da porcentagem de recuperação (Tabela 16)

Tabela 16 - Resultados do estudo da exatidão (recuperação) e precisão (CV%) do método (n=3).

Analito	**1º nível (0,045 µg g^{-1})**		**2º nível (0,300 µg g^{-1})**		**3º nível (2,250 µg g^{-1})**	
	% rec	**%CV**	**% rec**	**%CV**	**% rec**	**%CV**
AFB1	74	4	117	1	120	0,3
ZEA	100	8	108	2	80	3

Fonte: elaborada pelo autor.

A literatura recomenda valores de porcentagens de recuperação entre 70 a 120% com coeficiente de variação menor que 20% (THIER e ZEUMER, 1987) e, portanto, de acordo com os resultados encontrados pode-se concluir que o método é exato, com porcentagens de recuperação entre 74 e 120% e preciso, com CV máximo de 8%.

Quanto as diferenças observadas nas curvas realizadas no extrato da matriz e nas curvas extraídas, pode-se inferir que as recuperações acima de 100% obtidas para a AFB1, em concentrações mais elevadas (2º e 3º nível) são corrigidas ao

utilizarmos a curva extraída (% efeito matriz positiva). Enquanto que para a ZEA, observa-se o efeito oposto, uma redução da recuperação em concentrações mais elevadas (3º nível), também corrigida pela curva extraída, por apresentar um valor negativo de efeito matriz.

Portanto, todas as quantificações realizadas através dos processos de extração (no solo), serão feitas através das curvas extraídas, por apresentarem maior fidedignidade aos resultados.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme descrito no ítem 4.8.4, e os resultados estão expostos na Tabela 17.

Tabela 17 - Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método de extração.

Analito	**LD (ng g^{-1})**	**LQ (ng g^{-1})**
AFB1	8,0	45,0
ZEA	10,0	45,0

Fonte: elaborado pelo autor.

Estes limites estão adequados ao propósito para o qual o método foi desenvolvido, analisar o solo dos estudos de degradação e de sorção/dessorção. E também poderiam ser utilizados para análises de amostras ambientais, uma vez que os valores encontrados no ambiente, geralmente estão em concentrações na ordem de ng g^{-1}, conforme exposto na Tabela 3.

5.6 Estudo de degradação das micotoxinas em solo

O estudo de degradação, ou persistência nos fornece dados essenciais para a previsão da estabilidade das micotoxinas e o risco de lixiviação (percolação) para as águas subterrâneas e águas superficiais.

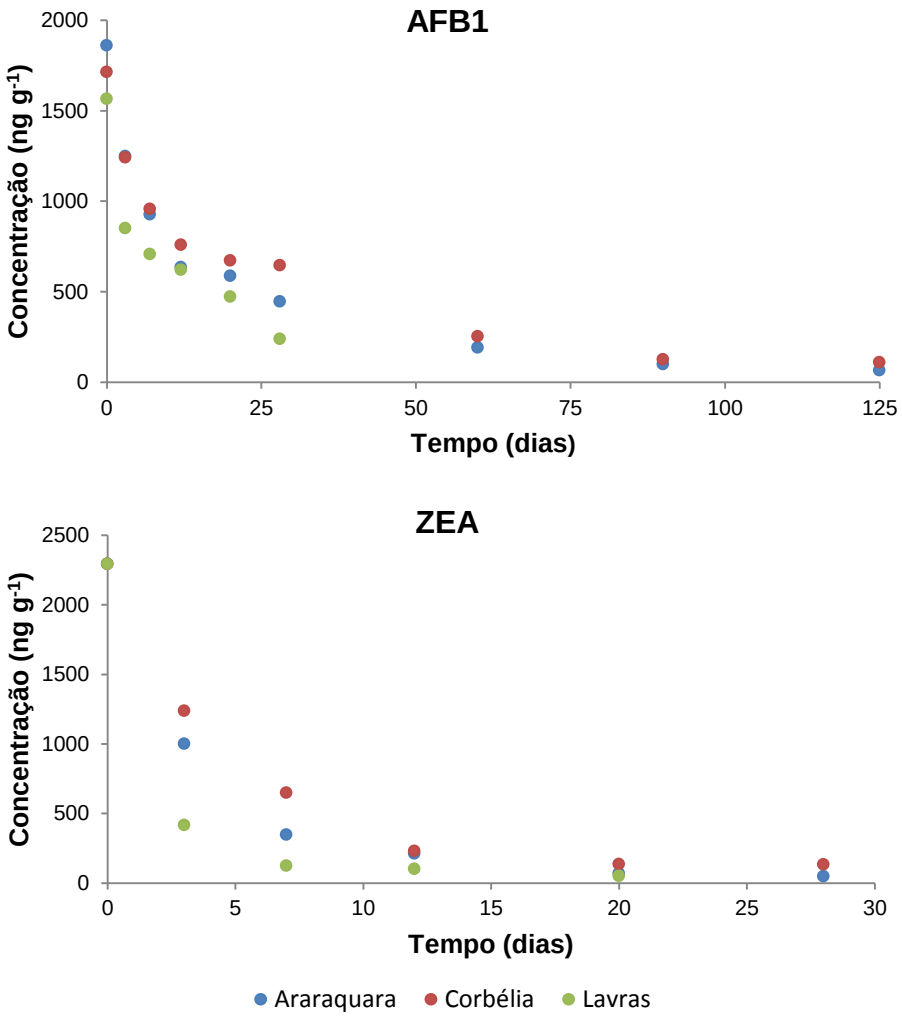
O experimento foi realizado conforme descrito no item 4.9, e as concentrações remanescentes das micotoxinas em função do tempo de incubação estão apresentadas na Tabela 18 e Figura 18.

Tabela 18 - Concentração remanescente das micotoxinas em função do tempo (n = 2)

Tempo (dias)	Concentração das micotoxinas (ng g^{-1}), CV (%)					
	AFB1			ZEA		
	Araraquara	Corbélia	Lavras	Araraquara	Corbélia	Lavras
0	1861 (2)	1713 (1)	1566 (1)	2294 (2)	2294 (1)	2295 (3)
3	1250(2)	1241 (1)	851 (5)	1001 (2)	1238 (3)	417 (5)
7	927 (13)	957 (25)	708 (6)	347 (10)	648 (20)	125 (15)
12	635 (25)	759 (3)	621 (6)	212 (4)	230 (2)	102 (1)
20	588 (1)	673 (1)	472 (3)	69 (8)	136 (17)	50 (14)
28	446 (6)	646 (19)	240 (17)	49 (12)	134 (20)	<LQ
60	192 (10)	254 (2)	<LQ	<LD	<LQ	<LD
90	100 (3)	126 (3)	<LD	<LD	<LD	<LD
125	67 (12)	110 (14)	<LD	<LD	<LD	<LD

LD AFB1 = 8ng g^{-1}; LQ AFB1 = 45ng g^{-1}; LD ZEA = 10ng g^{-1}; LQ ZEA = 45ng g^{-1}.
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18 - Degradação das micotoxinas nos três diferentes solos.



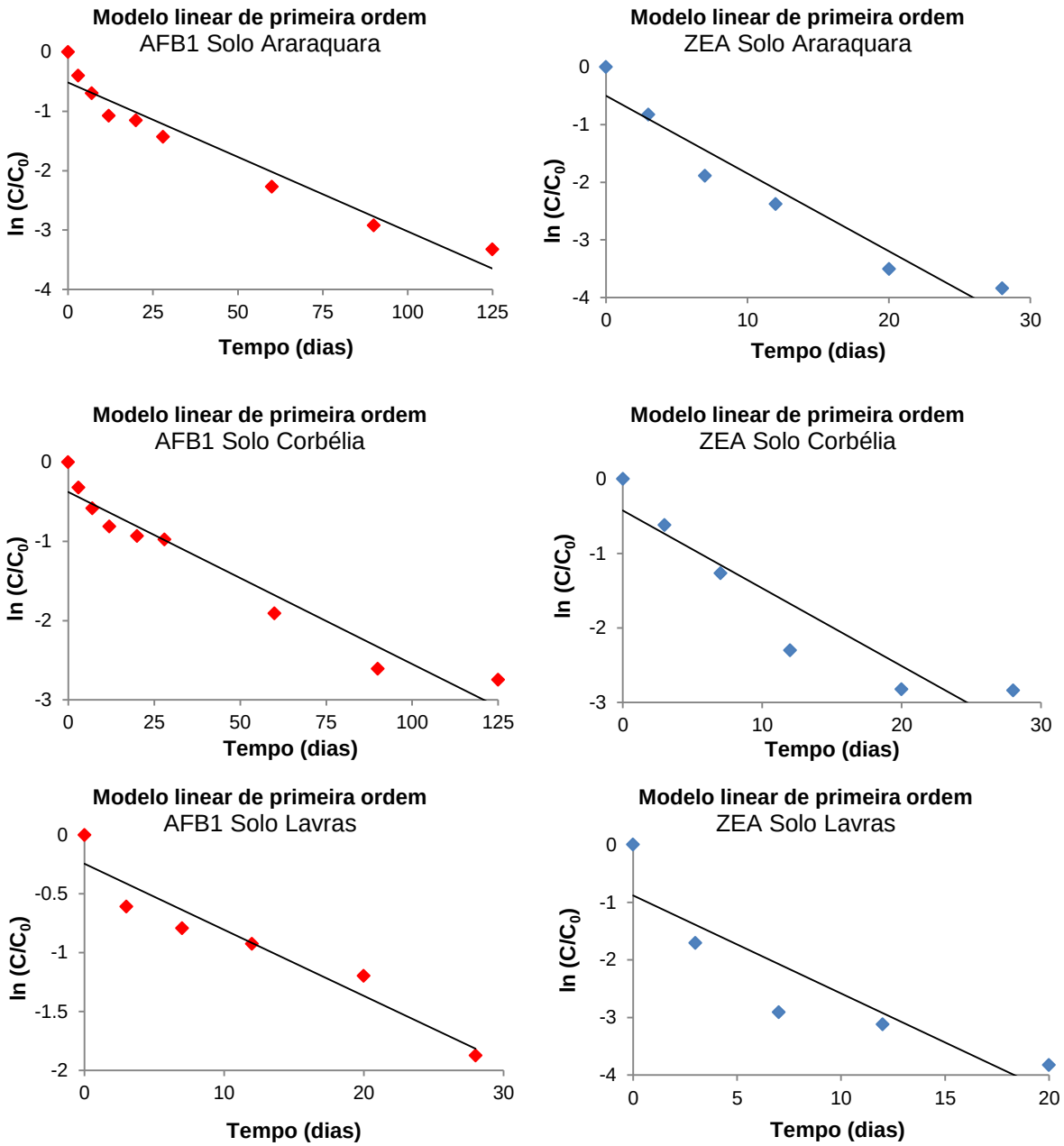
Fonte: elaborado pelo autor.

Com relação aos valores obtidos (Tabela 18) percebe-se que o coeficiente de correlação (CV) para as replicatas das leituras chegou a 25% para três amostras. Esse valor é justificado principalmente por dois fatores: 1) os processos de degradação são complexos, dependentes de muitas variáveis químicas, físicas e biológicas (GUSTAFSON; HOLDEN, 1990); 2) os valores são obtidos por meio do processo de extração das micotoxinas no solo, o qual já possui um erro experimental associado (Tabela 16). Conclui-se então, que um coeficiente de variação de até 25% demonstra boa precisão entre as replicatas do experimento.

A partir de uma análise preliminar dos dados, observa-se que a ZEA possui uma degradação mais rápida que a AFB1. Quanto aos tipos de solo estudados, nota-se que para as duas micotoxinas, houve degradação mais rápida no solo de Lavras. Quanto aos solos de Araraquara e Corbélia, por meio da comparação dos valores de porcentagem de degradação, utilizando-se o teste t de Student (95% de confiança) observa-se que há diferença significativa para a AFB1, onde há maior degradação no solo de Araraquara. Já para a ZEA, não houve diferença significativa entre os solos de Araraquara e Corbélia.

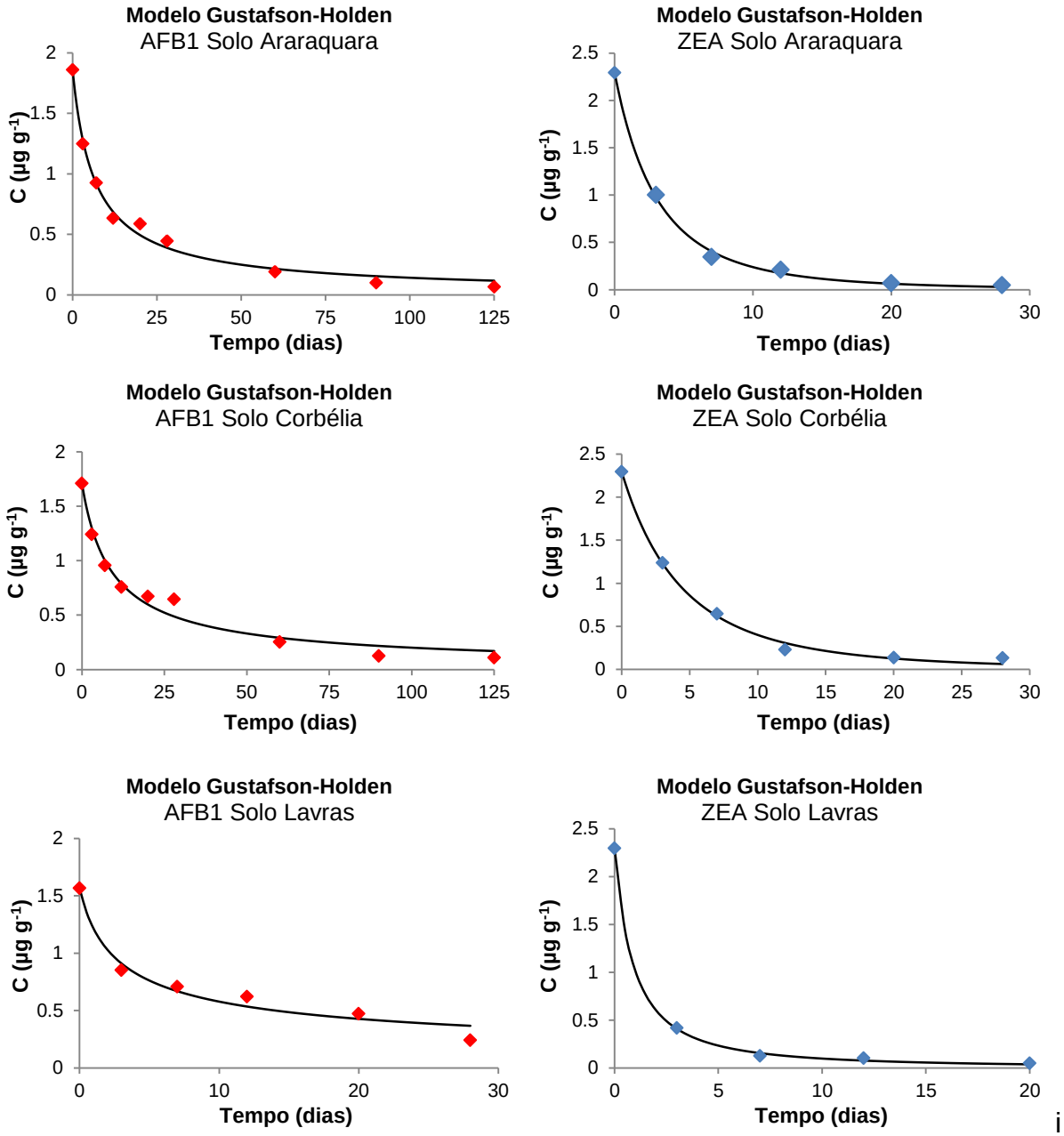
A partir dos valores de concentrações remanescente no solo (Tabela 18), foi possível obter os modelos cinéticos propostos (Figuras 19 e 20), calculados conforme descrito no ítem 4.9. Os parâmetros obtidos pelos dois modelos estão expostos na Tabela 19.

Figura 19 - Aplicação do modelo linear de primeira ordem para as micotoxinas, nos três solos.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 20 - Aplicação do modelo de Gustafson-Holden para as micotoxinas, nos três solos.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 19 - Equações dos modelos linear e de Gustafson-Holden de degradação das micotoxinas.

Modelo cinétido	Micotoxina	Solo	Equação	R^2
Linear de primeira ordem	AFB1	Araraquara	$\ln(C/C_0) = -0,025t - 0,513$	0,940
		Corbélia	$\ln(C/C_0) = -0,022t - 0,377$	0,941
		Lavras	$\ln(C/C_0) = -0,056t - 0,246$	0,920
	ZEA	Araraquara	$\ln(C/C_0) = -0,135t - 0,502$	0,928
		Corbélia	$\ln(C/C_0) = -0,104t - 0,423$	0,868
		Lavras	$\ln(C/C_0) = -0,170t - 0,884$	0,798
Gustafson-Holden	AFB1	Araraquara	$C = 1,861(1+0,173t)^{0,887}$	0,982
		Corbélia	$C = 1,710(1+0,138t)^{0,795}$	0,976
		Lavras	$C = 1,566(1+0,698t)^{0,480}$	0,965
	ZEA	Araraquara	$C = 2,294(1+0,099t)^{3,289}$	0,999
		Corbélia	$C = 2,295(1+0,066t)^{3,438}$	0,999
		Lavras	$C = 2,295(1+0,729t)^{1,486}$	0,999

Fonte: elaborada pelo autor.

Com os valores da constante K, e os parâmetros α e β, encontrados a partir dos modelos cinéticos, foram calculados, conforme descrito no ítem 4.9 os tempos de meia vida ($t_{1/2}$ e DT_{50}) e também o tempo para o desaparecimento de 90% da substância (DT_{90}), apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Valores de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$ e DT_{50}) e (DT_{90}) das micotoxinas, obtidos pelos modelos cinéticos de degradação.

		Linear de primeira ordem		Gustafson-Holden	
Micotoxina	**Solo**	**$T_{1/2}$ (dias)**	**DT_{90} (dias)**	**DT_{50} (dias)**	**DT_{90} (dias)**
AFB1	Araraquara	28	92	7	72
	Corbélia	32	106	10	124
	Lavras	12	41	5	172
ZEA	Araraquara	5	17	2	10
	Corbélia	7	22	3	14
	Lavras	4	14	1	5

Fonte: elaborada pelo autor.

Em geral, o modelo matemático mais usado para descrever a degradação de uma substância no solo é o Linear de primeira ordem (SWARCEWICZ;

GREGORCZYK, 2013), porém os dados experimentais geralmente apresentam um decaimento rápido no início, seguido de etapa mais lenta ao final do processo. Esta observação pode ser explicada, fisicamente, pelo modelo de Gustafson-Holden, onde é considerada a existência de algumas regiões mais expostas do solo, que em uma primeira fase, interagem rapidamente com as micotoxinas, mas estas áreas acabam ficando esgotadas, deixando um resíduo que se dissipa mais lentamente (GUSTAFSON; HOLDEN, 1990).

Dentre os dois modelos cinéticos avaliados, uma inspeção visual das curvas (Figuras 17 e 18) e, mais precisamente, uma avaliação dos valores dos coeficientes de correlação obtidos (R^2, Tabela 19) nota-se que o modelo sugerido por Gustafson-Holden é o que melhor explica a degradação das duas micotoxinas nos três tipos de solo estudados, apresentado valores de R^2 superiores a 0,96, o que mostra uma boa correlação entre o modelo proposto e os dados obtidos experimentalmente. De maneira geral, os valores de DT_{50} e DT_{90} mais exatos são os obtidos por este mesmo modelo, porém é possível observar a presença de duas exceções, que foram as extrapolações dos valores de DT_{90} encontrados pelo modelo de Gustafson-Holden para AFB1 nos solos de Lavras e Corbélia. Nesses dois casos, os valores obtidos pelo modelo linear, apresentaram resultados mais coerentes com os valores experimentais.

Ao observamos os valores de DT_{50} tem-se em ordem crescente, para as duas micotoxinas Lavras<Araraquara<Corbélia, já os valores de carbono da biomassa microbiana (Tabela 14) seguem uma ordem distinta Araraquara<Lavras<Corbélia. Diante disso, supõe-se que os processos biológicos podem não ser os predominantes na degradação e, portanto, para este estudo infere-se que os processos químicos tenham maior importância.

Quanto aos processos químicos, para ZEA e AFB1, observa-se que, no solo com maior teor de silte e argila (Corbélia), há uma degradação mais lenta (maior tempo de meia-vida), muito provavelmente devido à elevada sorção das micotoxinas à essas frações do solo. Esse mesmo efeito foi encontrado no trabalho de degradação desenvolvido por Mortensen et al. (2006) para ZEA e OTA. Porém, os teores de silte nos solos de Araraquara e Lavras são muito próximos, e, nesse caso, a maior atividade microbiana no solo de Lavras, deve ter influenciado para aumentar a taxa de degradação das micotoxinas.

Os valores obtidos para o tempo de meia vida da ZEA (de 1 a 3 dias) foram bem menores que os encontrados no trabalho desenvolvido por Mortensen et al. (2006) (de 6 a 16 dias). Interessante notar, que o tipo de solo utilizado no estudo de Mortensen, Strobel e Hansen (2006) é arenoso, o que poderia causar uma diminuição no tempo de meia vida, devido à possível menor sorção das micotoxinas, mas o efeito oposto foi observado, muito provavelmente devido à diferença de temperatura dos estudos, uma vez que Mortensen, Strobel e Hansen realizaram o experimento à temperatura de 18ºC, seguindo as condições climáticas do hemisfério norte, enquanto o experimento deste trabalho foi realizado à 25ºC, por refletir as condições de clima tropical.

Quanto aos tempos de meia vida obtidos, nota-se uma diferença de até 100% entre os solos, por exemplo de 5 dias, para a AFB1 no solo de Lavras para 10 dias no solo de Corbélia. Essa variação mostra o quão complexo e variável pode ser a degradação dessas micotoxinas no ambiente, uma vez que apresentam valores muito diferentes, nas mesmas condições experimentais, e com solos que também não possuem grandes diferenças em suas propriedades. Uma justificativa para essa diferença, pode ser devido à diferença no tipo de microrganismo presente nos solos, uma vez que foi determinada apenas a massa total de microrganismo e não sua caracterização. Possivelmente, determinadas cepas tenham maior poder de degradação destas substâncias do que outras.

Ao compararmos os tempos de meia vida obtidos para a AFB1 (de 5 a 10 dias) e para ZEA (de 1 a 3 dias) com os tempos de meia vida de três pesticidas, os quais foram encontrados para um solo argiloso, e em condições de clima tropical, 80 dias para diuron, 84 dias para hexadiona e 128 dias para tebutiurom, nota-se que os valores encontrados para este trabalho aparentemente demonstram um menor potencial de impacto ambiental para essas micotoxinas, quando comparadas a estes pesticidas (LOURENCETTI; MARCHI; RIBEIRO, 2012).

Por outro lado, como exposto no ítem 1.1.1, o principal metabólito da AFB1, a AFM1 também apresenta propriedades carcinogênicas, enquanto os metabólitos da ZEA (α-ZOL e β-ZOL) possuem características de alteradores endócrinos (ítem 1.1.2), mostrando que, embora o tempo de meia vida das micotoxinas seja curto, não se tem informações sobre o processo de degradação dos metabólitos, o que pode ser preocupante, uma vez que há um aporte contínuo dessas substâncias relacionadas à excreta de humanos e animais. Também é importante ressaltar que

os efeitos das micotoxinas e metabólitos, de forma combinada ainda são desconhecidos.

Além dos metabólitos, também deve-se considerar a presença dos produtos de degradação dessas substâncias, uma vez que durante as reações de decomposição, subprodutos desconhecidos e possivelmente nocivos podem ser criados (HARKAI et al., 2016).

5.7 Estudo de sorção e de dessorção das micotoxinas em solo

5.7.1 Estudo preliminar 1 - Escolha do filtro de seringa

O experimento foi realizado conforme descrito no ítem 4.10.1 e os valores das áreas obtidos para cada tipo de filtro, e analito, foram comparados com os valores do tratamento 1, no qual as soluções não foram filtradas, obtendo assim, os valores de recuperações (%rec). Já o coeficiente de variação (CV) foi encontrado entre as replicadas (n=5) de cada tratamento. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21 - Valores percentuais de recuperação e coeficiente de variação para os analitos com diferentes filtros (n=5).

Analito	PVDF		PTFE		PA		CR	
	% rec	%CV	% rec	%CV	% rec	%CV	% rec	%CV
AFB1	62	33	100	1	79	32	96	4
ZEA	5	62	94	3	13	77	78	21

Legenda: Nylon (Poliamida - PA); Politetrafluoroetileno (PFTE); Difluoreto de polivinilideno (PVDF); Celulose Regenerada (CR)
Fonte: elaborada pelo autor.

Como pode ser observado na Tabela 21, os melhores resultados foram obtidos com os filtros de PTFE, que além de apresentarem melhor recuperação, ou seja, menor retenção no filtro para os dois analitos, também apresentaram o menor coeficiente de variação, o que indica maior repetibilidade dos resultados. Para a ZEA, por exemplo, mesmo que aproximadamente 6% do analito fique retido no filtro, esta quantidade será praticamente constante, não havendo problema na

repetibilidade dos experimentos de sorção/dessorção, os quais possuem uma etapa de filtração da solução de $CaCl_2$ 0,01M.

5.7.2 Estudo Preliminar 2 - Avaliação da resposta cromatográfica em solução de $CaCl_2$ 0,01M

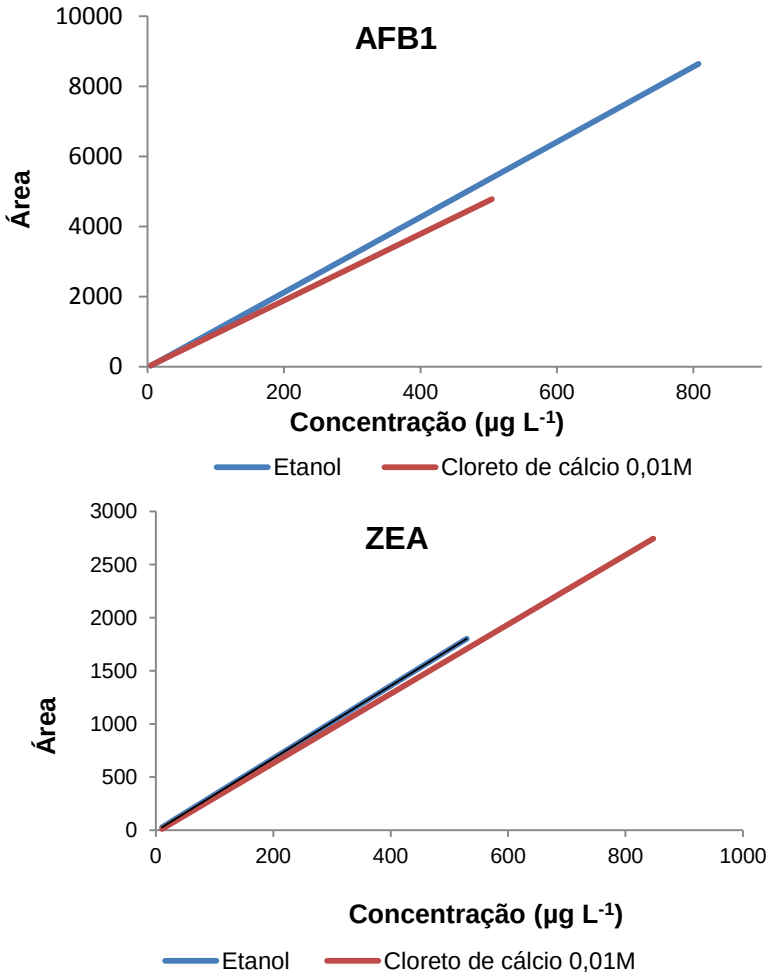
Como o estudo de sorção/dessorção é realizado em solução de cloreto de cálcio 0,01M, avaliou-se, como em um estudo de efeito matriz, a influência desse meio na resposta cromatográfica. Este estudo foi realizado conforme descrito no ítem 4.10.2. Os resultados estão expostos na Tabela 22 e representados nas curvas da Figura 21.

Tabela 22 - Comparação entre as curvas analíticas dos analitos em etanol e cloreto de cálcio 0,01M.

Analito	Solvente	Coef Angular	Coef Linear	R^2	Número de pontos anômalos removidos	Teste de homocedas-ticidade	Pondera-do?	% Efeito Matriz
AFB1	EtOH	10,73	-26,75	0,999	0	tcalc = -1,47 tcrit = 2.31	Não	-12
	$CaCl_2$	9,49	-8,22	0,987	1	tcalc = -2,32 tcrit = 2,36	Sim, $1/y^2$	
ZEA	EtOH	3,42	-7,16	0,999	2	tcalc = -0,52 tcrit = 2,57	Não	- 5
	$CaCl_2$	3,22	-21,27	0,999	1	tcalc = 1,34 tcrit = 2,45	Não	

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 21 - Curvas analíticas em etanol e Cloreto de cálcio 0,01M para AFB1 e ZEA.



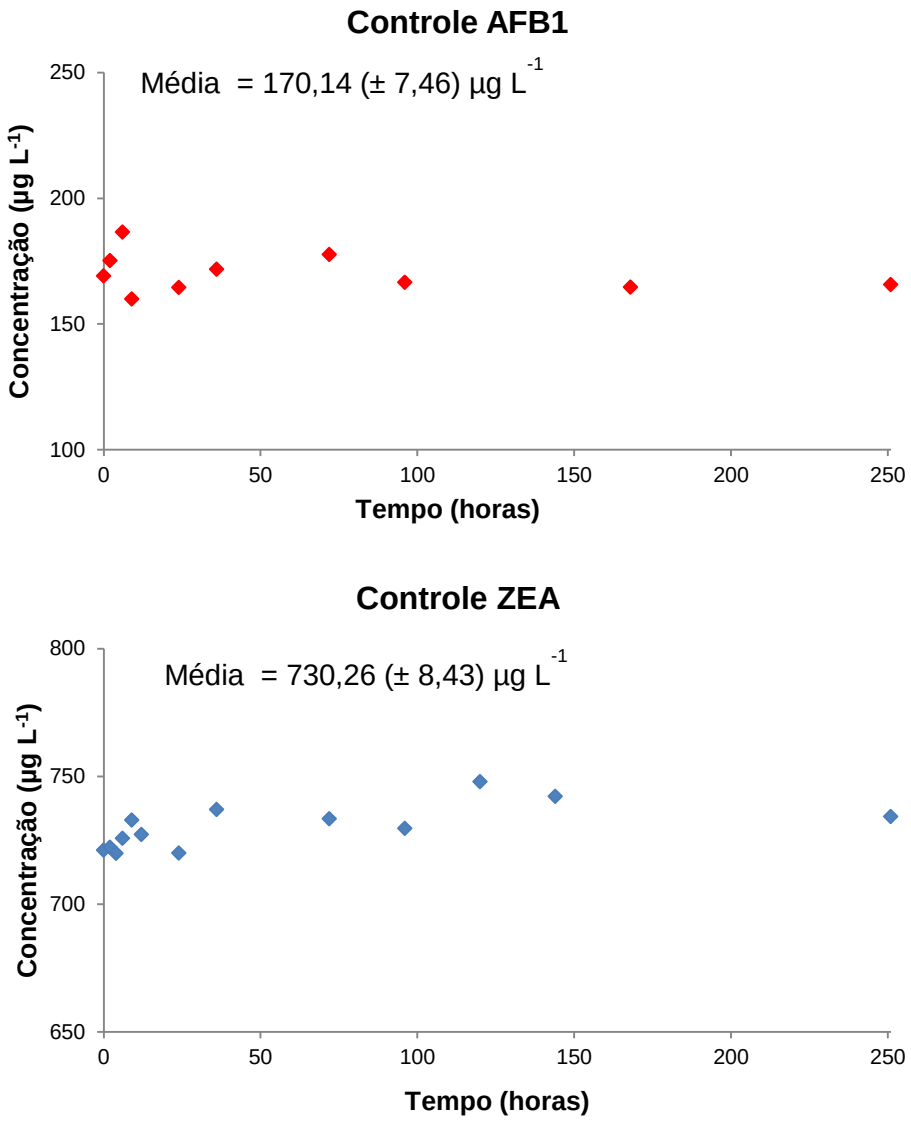
Fonte: elaborada pelo autor

Conforme observado na Tabela 22, existe efeito matriz de -12% na resposta cromatográfica da AFB1, e de -5% para a ZEA. A partir das curvas analíticas (Figura 21) pode-se notar uma tendência à um aumento na diferença entre as curvas, em concentrações maiores. Como o tratamento estatístico realizado para as construções das curvas é criterioso, faz-se necessário, a fim de manter a relevância estatística do trabalho, a utilização do mais fidedigno meio de calibração e, portanto para as duas substâncias foram utilizadas as curvas em $CaCl_2$ 0,01M na quantificação das amostras obtidas no estudo de sorção/dessorção e também nos estudos das isotermas.

5.7.3 Estabilidade do analito

Tanto a estabilidade dos analitos, quanto a verificação de que não há adsorção dos mesmos, nos frascos dos experimentos, pode ser confirmada pelo grupo controle do estudo de sorção (Figura 7). Onde os frascos contendo as micotoxinas em solução de cloreto de cálcio 0,01M são mantidas nas condições do estudo por um período de 250 horas, sendo realizadas 10 leituras durante esse intervalo. A Figura 22 apresenta os resultados obtidos em função do tempo de leitura.

Figura 22 - Concentração em função do tempo para cada um dos analitos durante o experimento de sorção.



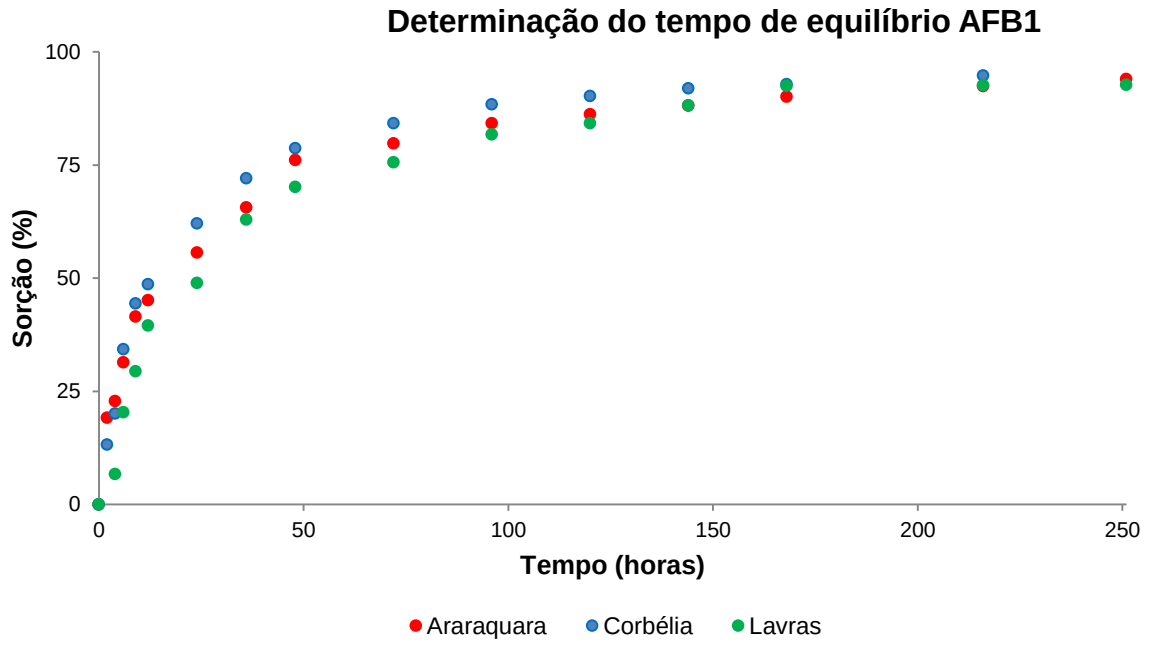
Fonte: elaborada pelo autor

Como pode ser observado, as concentrações obtidas no estudo que foi desenvolvido durante 251 horas foram muito similares. O grupo controle da AFB1 apresentou um coeficiente de variação de 4%, enquanto que a ZEA o valor obtido foi de 1%. Estes valores indicam a estabilidade dos dois analitos neste período, assim como evidenciam que não ocorre a sorção de ambos nos frascos dos experimentos. Podendo-se inferir que não haverá este tipo de problema nos estudos de sorção nos solos.

5.7.4 Determinação do tempo de equilíbrio, balanço de massa e da razão solo/solução

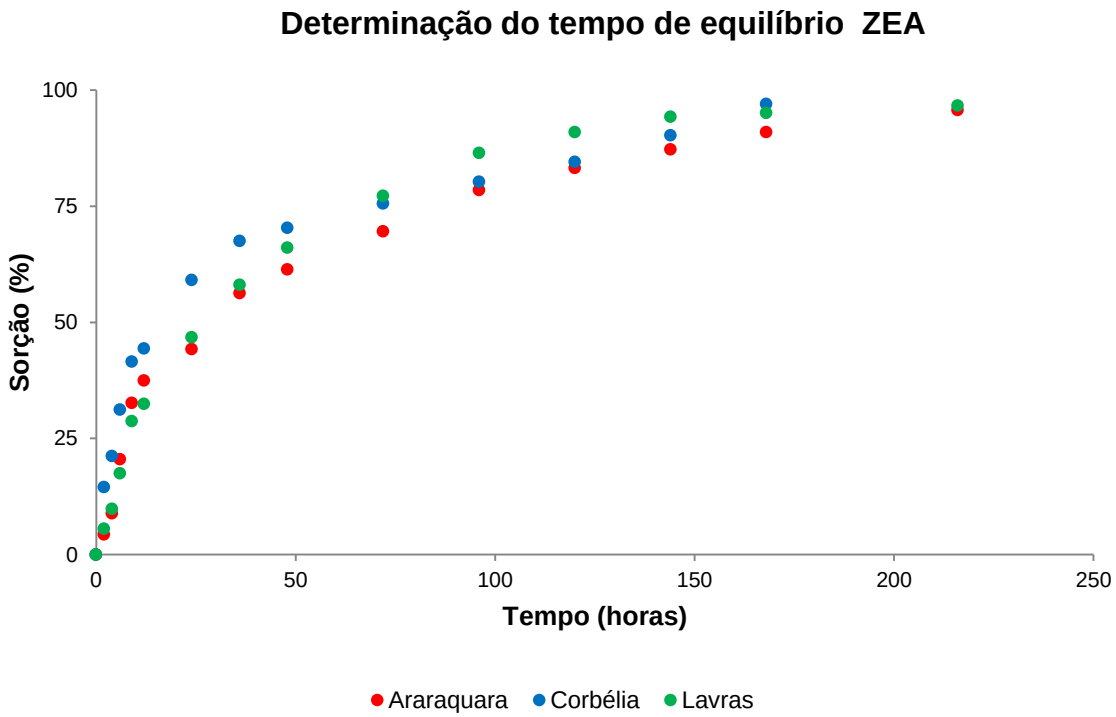
A porcentagem de sorção (Equação 18) foi calculada para cada tempo, com base no valor da concentração inicial e na concentração determinada no momento da amostragem e representada graficamente em função do tempo conforme apresentado nas Figuras 23 (AFB1) e 24 (ZEA) nos três solos (Araraquara, Corbélia e Lavras)

Figura 23 - Cinética de sorção para a AFB1 nos solos de Araraquara (vermelho), Corbélia (azul) e Lavras (verde).



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 24 - Gráfico da cinética de sorção para a ZEA nos solos de Araraquara (vermelho), Corbélia (azul) e Lavras (verde).



Fonte: elaborada pelo autor

Observou-se que há um aumento constante nas porcentagens de sorção para os dois analitos, nos três tipos de solo testados. Porém, nota-se também que existe um rápido aumento na % de sorção até o tempo de 48 horas, e apartir de então, ainda ocorre a sorção, porém de maneira mais lenta. O guia 106 da OECD trata essa falta de patamar como uma dificuldade para a realização do teste, uma vez que pode ser devido à degradação dos analitos, ou até mesmo devido a um processo de difusão lenta (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000). Quanto ao processo de degradação, o mesmo guia aconselha a refazer o teste em solo esterilizado, mas, uma vez que os estudos são realizados para entender a dinâmica dessas micotoxinas no ambiente, a utilização de solo esterilizado não é interessante para este trabalho.

Uma maneira de resolver este dilema é a realização de um experimento de balanço de massa, onde escolheu-se o solo com o menor tempo de meia vida para os dois analitos (solo de Lavras, conforme exposto na Tabela 20) e realizou-se um estudo conforme descrito no ítem 4.10.3.2. O propósito deste estudo, foi encontrar o

tempo máximo em que o experimento de sorção pode ocorrer, sem haver a degradação dos analitos. Para isso, realiza-se um novo experimento, onde a cada intervalo de tempo são analisadas as duas fases, o solo (por meio de uma extração, fluxograma da Figura 6) e a fase aquosa. E a soma das massas dos analitos encontradas nas duas fases (solo + fase aquosa) é comparada com o valor das massas nos grupos controles, para cada leitura. Com os valores das médias e dos desvios, foram realizados os cálculos (Equações 22 e 23, página 59), cujos resultados encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23 - Resultados obtidos no estudo de conservação de massa, para AFB1 e ZEA.

Tempo (horas)	**$T_{tabelado}$ ($n_1 + n_2 - 2$; 95% confiança) = 2,776***			
	AFB1		**ZEA**	
	$T_{calculado}$	**Há conservação de massa?**	**$T_{calculado}$**	**Há conservação de massa?**
0	1,243	Sim	2,428	Sim
24	2,103	Sim	0,630	Sim
48	1,084	Sim	0,152	Sim
72	0,876	Sim	2,856	Não
96	3,511	Não	3,548	Não

***** n_1 é o número de medidas do grupo 1; n_2 é o número de medidas do grupo 2
Fonte: elaborada pelo autor.

Para o tempo de 0, 24 e 48 horas houve conservação da massa para as duas micotoxinas, porém na leitura realizada após 72 horas, já foi possível observar uma perda de massa significativa da ZEA. E para a leitura realizada no tempo de 96 horas, o balanço de massa não foi positivo para nenhum dos analitos.

De acordo com esses resultados, optou-se por realizar o estudo de sorção por 48 horas, para garantir que toda a massa perdida na fase aquosa estaria adsorvida no solo. Após esse período, o decréscimo na concentração das micotoxinas, em solução, poderia também, ser proveniente de degradação.

Após a escolha do tempo de equilíbrio, voltou-se para o primeiro estudo de sorção (preliminar) para calcular os valores de % de sorção (Equação 18) e K_d (Equação 19), expostos na Tabela 24, necessários para encontrar a melhor razão solo/solução para o estudo.

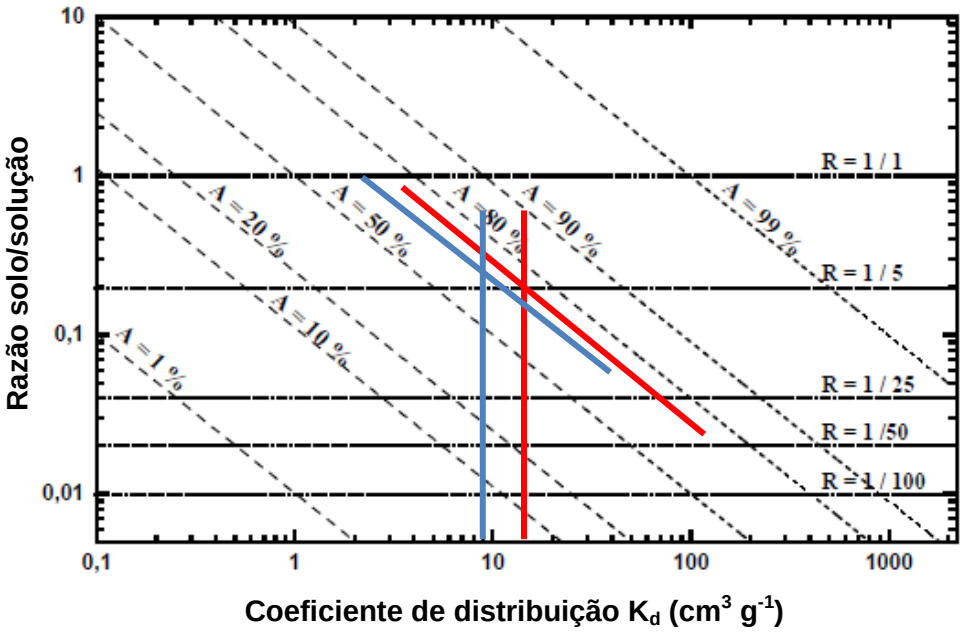
Tabela 24 - Valores de sorção e Kd para cada analito, nos três tipos de solo.

Analitos	Solo Araraquara		Solo Corbélia		Solo Lavras	
	% sorção	K_d (cm^3 g^{-1})	% sorção	K_d (cm^3 g^{-1})	% sorção	K_d (cm^3 g^{-1})
AFB1	76	15	79	17	70	11
ZEA	61	7	70	11	66	9

Fonte: elaborada pelo autor.

Para a AFB1 a média dos valores encontrados para os coeficientes de sorção (K_d) obtidos para os três tipos de solo foi de 14 cm^3 g^{-1} e a sorção foi 75%. Já para a ZEA, o valor médio encontrado para Kd foi de 9 cm^3 g^{-1} e a sorção de 66%. A Figura 25 apresenta o gráfico de correlação entre Kd e razão massa de solo/volume de solução utilizado para a escolha da razão solo/solução. As linhas em vermelho apresentam os valores obtidos para a AFB1, enquanto as linhas azuis apresentam os valores obtidos para a ZEA.

Figura 25 - Correlação entre Kd e razão massa de solo/volume de solução Em destaque a interpolação de dados para escolha da melhor razão solo/solução para AFB1 (vermelho) e ZEA (azul). A 75 e 66 % de sorção, respectivamente.



Fonte: modificado de Teste 106 do Guia da Organisation for Economic Co-Operation and Develompent (2000).

A intersecção entre os valores de Kd e % sorção mostram que a razão 1/5 é a melhor opção para os dois analitos, podendo assim, seguir os experimentos com 5 g de solo e 25 mL de solução.

5.7.5 Cinética de Sorção

As curvas de sorção em função do tempo (cinética de sorção) são construídas, calculando-se a porcentagem de sorção a cada leitura (0; 6;12; 24; 36 e 48h), os cálculos simplificados estão descritos no ítem 4.10. De forma detalhada, os cálculos foram realizados conforme descrito no Guia 106 OECD, para o método realizado em sequência (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000).

Esta abordagem foi de grande relevância ao estudo, pois fornece informações sobre o comportamento de sorção em intervalos pequenos de tempo, o que pode complementar os resultados obtidos com as isotermas. Nenhum estudo anterior, disponível na literatura, para as micotoxinas AFB1 e ZEA apresentou esta avaliação.

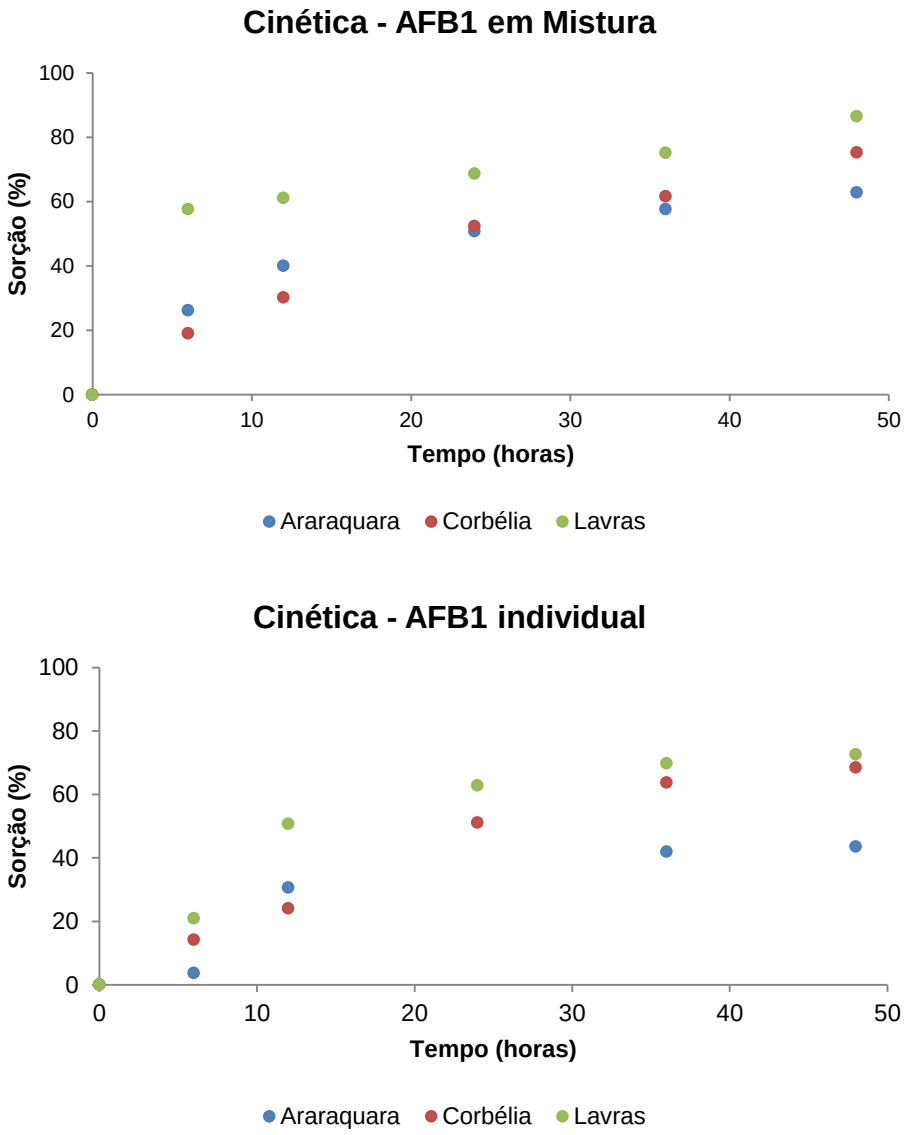
A Tabela 25 apresenta os valores obtidos para a sorção (%) encontradas no equilíbrio, para o estudo em mistura e individual, os gráficos que representam a cinética de sorção para cada experimento estão apresentados na Figura 26 para a AFB1, e na Figura 27 para ZEA.

Tabela 25 - Valores de sorção (%) para cada analito, nos estudos individuais e em mistura, para os três tipos de solo (n=2).

	AFB1 (%)		ZEA (%)	
Solo	Mistura	Individual	Mistura	Individual
Araraquara	60	42	63	41
Corbélia	75	67	67	57
Lavras	86	72	82	72

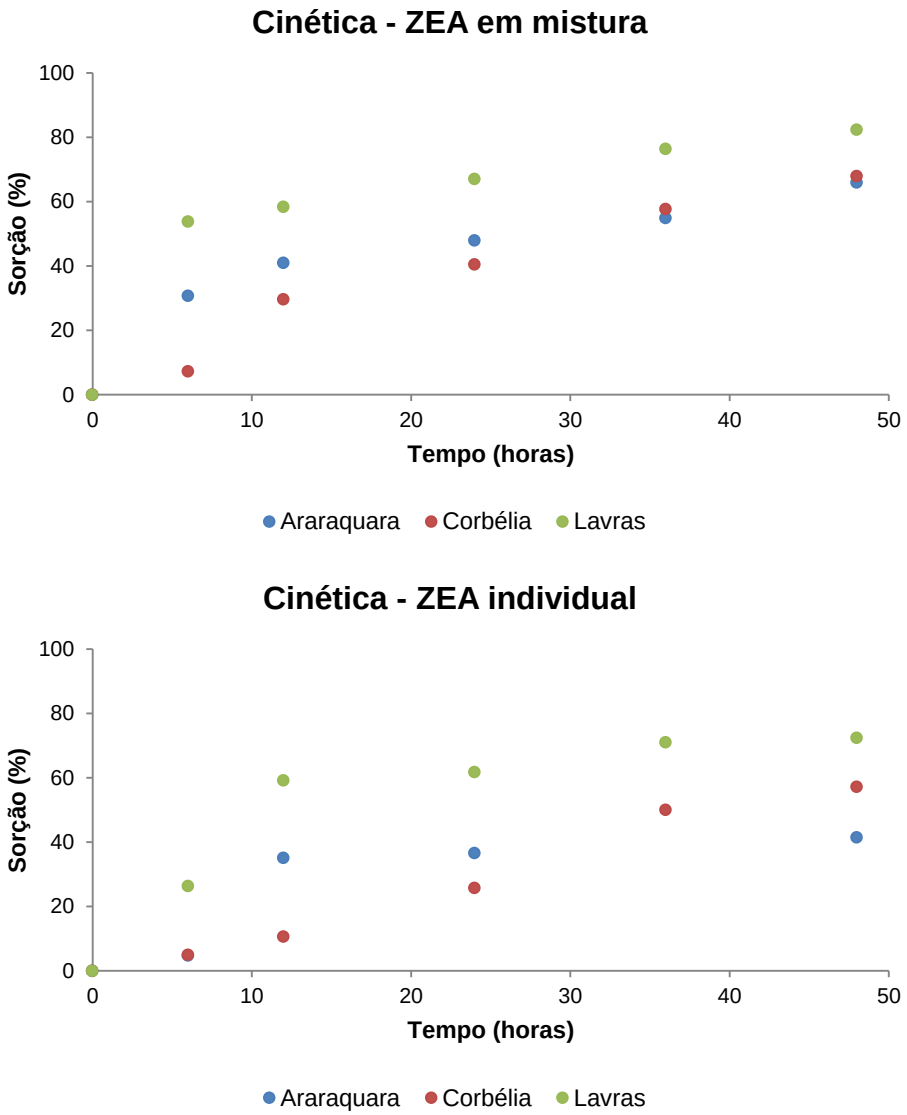
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 26 - Cinética de sorção para AFB1 nos três tipos de solo, em mistura e individual.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 27 - Cinética de sorção para ZEA nos três tipos de solo, em mistura e individual.



Fonte: elaborada pelo autor

De forma geral, observa-se pelo exposto nas Figuras 24 e 25 que, para todos os experimentos, há uma fase inicial, de rápida sorção (até 12 horas), na qual os sítios mais acessíveis do solo são rapidamente ocupados, seguida de uma etapa mais lenta, fazendo com que as micotoxinas permaneçam por mais tempo na solução. Esse efeito pode ser negativo em nível ambiental, uma vez que, enquanto os estudos de degradação em solo apresentaram tempo de meia vida relativamente rápidos, os experimentos de estabilidade do analito realizados em solução (nas mesmas condições de temperatura) apontaram que não há nenhuma evidência de

degradação das micotoxinas na solução, em um período de aproximadamente 10 dias, como mostrado no ítem 5.7.3. Além do que, estando na fase aquosa estas substancias estão disponíveis para serem dispersas para outros compartimentos ambientais, como água superficial e subterrânea.

Para compreensão dos resultados obtidos, os mesmos foram discutidos sob dois pontos de vista distintos: 1) comparando-se os resultados por tipo de solo avaliado; 2) comparando-se os resultados dos estudos com as micotoxinas individuais e em mistura.

1) Comparando-se os tipos de solos analisados

De acordo com os dados da Tabela 25, e também por meio do teste T Student para um intervalo de confiança de 95%, pode-se observar padrões semelhantes de sorção para as duas micotoxinas, com relação aos solos analisados, tanto para o estudo individual, quanto para o experimento em mistura.

Para a AFB1 todos os valores obtidos, quando comparados os tipos de solo encontrados, são diferentes estatisticamente, onde em ordem crescente de sorção: Araraquara<Corbélia<Lavras.

Para a ZEA, os valores encontrados de sorção (%) para os solos de Araraquara e Corbélia não apresentam diferença significativa, devido aos maiores desvios observados entre as replicatas dos experimentos. Mas, diferem estatisticamente com o solo de Lavras. Portanto, em ordem crescente de sorção têm-se: Araraquara≈Corbélia<Lavras.

2) Comparando-se os resultados dos estudos com as micotoxinas individuais e em mistura

De acordo com os valores de sorção obtidos (Tabela 25) e os resultados do teste T Student para um intervalo de confiança de 95%, pode-se observar que também existe o mesmo padrão de sorção para as duas micotoxinas, com relação ao tipo de estudo. Em que, para os solos de Araraquara e Lavras, o estudo em mistura apresentou um valor de sorção mais elevado, quando comparado com o estudo individual. Já para o solo de Corbélia, não houve diferença estatística entre os resultados de sorção dos dois estudos.

Outra característica importante é o quão semelhante são os valores obtidos para as duas micotoxinas, nos diferentes solos e tratamentos, o que pode nos indicar, que nessa faixa de concentração avaliada, os processos de sorção, para ambas, são semelhantes. Porém, conforme exposto anteriormente, o estudo da cinética de sorção nos mostra o perfil da sorção (em apenas uma concentração). Os estudos das Isotermas são mais precisos quanto aos dados de sorção, por avaliarem diferentes concentrações, por este motivo as relações entre as características do solo e seus efeitos na sorção das micotoxinas serão avaliadas após o estudo das isotermas.

5.7.6 Cinética de dessorção

As curvas de dessorção em função do tempo (cinética de dessorção) são construídas, calculando-se a porcentagem de dessorção a cada leitura (6;12; 24; 36 e 48h), os cálculos simplificados estão descritos no ítem 4.10. De forma detalhada, os cálculos foram realizados conforme descrito no Guia 106 OECD, para o método realizado em sequência (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000).

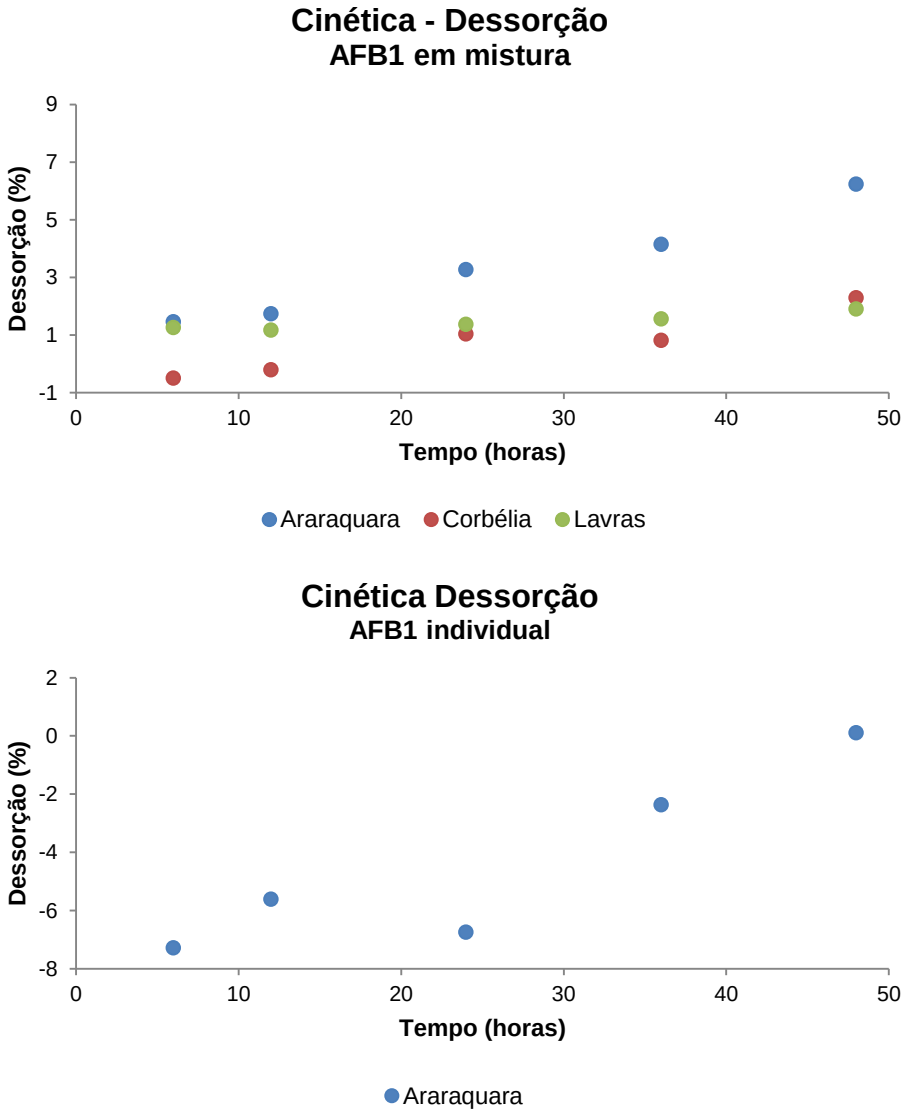
A Tabela 26 apresenta os valores obtidos para a dessorção (%) encontradas no equilíbrio, para o estudo em mistura e individual, os gráficos que representam a cinética de dessorção para cada experimento está disposto na Figura 28 para a AFB1, e na Figura 29 para ZEA.

Tabela 26 - Valores de dessorção (%) para cada analito, nos estudos individuais e em mistura, para os três tipos de solo

	AFB1		ZEA	
Solo	**Mistura**	**Individual**	**Mistura**	**Individual**
Araraquara	6	0,1	4	2
Corbélia	1,5	NC	0,04	1,6
Lavras	2	NC	0,9	1,5

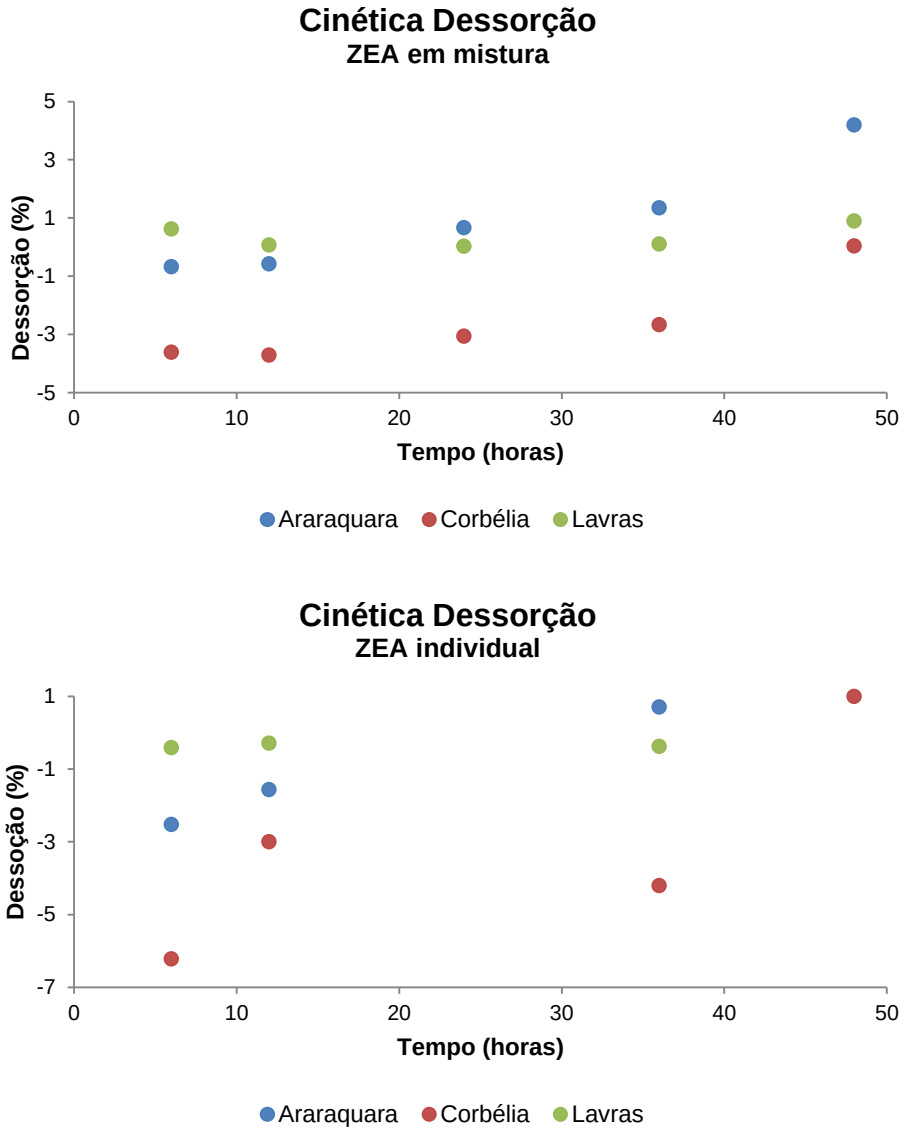
NC: não calculado, pois os valores de concentração obtidos nos experimentos estavam abaixo do limite de quantificação instrumental (LQ=5ng mL^{-1}).
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 28 - Cinética de dessorção para AFB1 nos três tipos de solo, em mistura e individual.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 29 – Cinética de dessorção para ZEA nos três tipos de solo, em mistura e individual.



Fonte: elaborada pelo autor

De forma geral, de acordo com os gráficos apresentados nas Figuras 26 e 27, observa-se que há um aumento gradual na porcentagem de dessorção para as duas micotoxinas, nos dois estudos e três tipos de solo, porém chegando a valores de no máximo 6 % (para AFB1, em mistura, no solo de Araraquara). É importante ressaltar, que nos estudos de conservação de massa, observou-se que para a AFB1, há conservação até 72 horas, e para a ZEA até 48 horas. Como o experimento de dessorção é realizado após o de sorção, pode-se inferir, que durante o estudo de dessorção, pode estar havendo, além da dessorção, a degradação dos mesmos.

Seguindo o mesmo método de análise apresentado no estudo de sorção, os resultados obtidos foram discutidos sob dois pontos de vista distintos: 1) comparando-se os resultados por tipo de solo avaliado; 2) comparando-se os resultados dos estudos com as micotoxinas individuais e em mistura.

1) Comparando-se os tipos de solo analisados

Quanto aos testes estatísticos realizados, pode-se afirmar que não há diferença significativa para os três tipos de solo no estudo individual para ZEA, enquanto que, para o estudo em mistura, todos os valores foram considerados diferentes (Corbélia<Lavras<Araraquara).

Já para a AFB1, não foi possível quantificar as concentrações obtidas no estudo individual para os solos de Corbélia e Lavras, e quanto ao estudo em mistura, todos os solos apresentaram valores de dessorção considerados, estatisticamente, diferentes (Corbélia<Lavras<Araraquara).

2) Comparando-se os resultados dos estudos com as micotoxinas individuais e em mistura

Com relação ao tipo de estudo, para a AFB1 foi possível, apenas, a comparação do solo de Araraquara, onde o estudo de dessorção realizado em mistura apresentou valor muito superior, quando comparado ao individual. Para a ZEA, no solo de Araraquara foi observado o mesmo comportamento (maior dessorção para o estudo em mistura). Porém, para os demais solos (Corbélia e Lavras) não houve diferença significativa.

5.7.8 Isotermas de sorção

As isotermas possuem um papel importante na elucidação do comportamento das substâncias no ambiente. Esses dados podem contribuir com a estimativa de riscos apresentados por tais compostos e avaliar a influência da concentração na extensão da sorção (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000). A avaliação dos processos de sorção, em diferentes concentrações, podem apresentar valores mais fidedignos de sorção (%) e também fornecer os valores dos coeficientes de sorção, dos diferentes modelos matemáticos avaliados. O experimento foi realizado conforme descrito no fluxograma da Figura 10, nas concentrações apresentadas na Tabela 7.

Para a construção das isotermas, foram utilizadas as concentrações encontradas, no tempo de equilíbrio (48 horas) da fase aquosa (C_e, µg cm^{-3}). Os valores obtidos, com os respectivos coeficientes de variação (n=2) estão apresentados na Tabela 27.

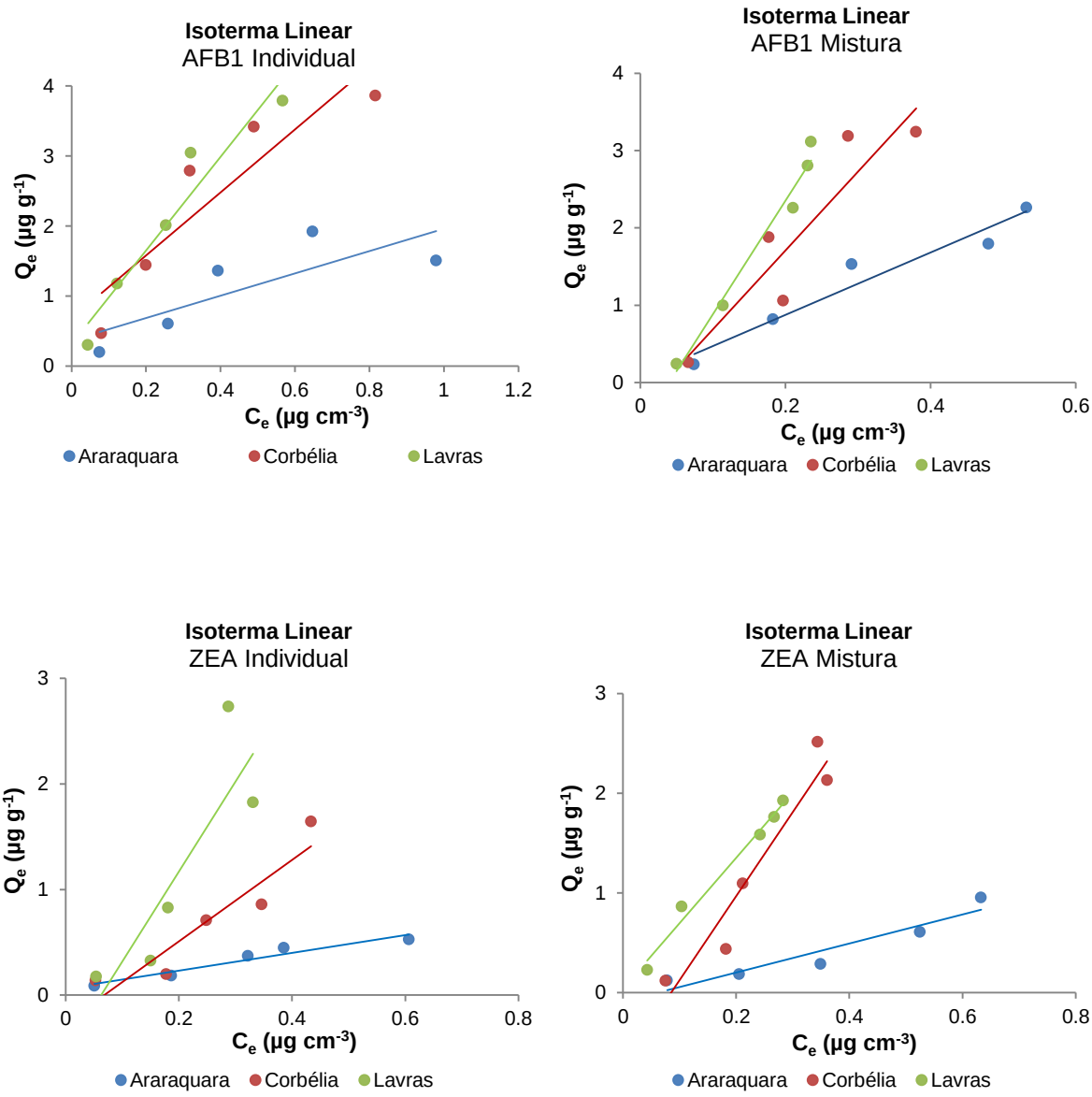
Tabela 27 - Concentrações dos analitos na fase aquosa dos experimentos, ao atingirem o equilíbrio (48horas).

Micotoxina	Estudo	Solo	Concentração, µg L^{-1} e (CV, %)				
			Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
AFB1	Mistura	Araraquara	75(5)	183(4)	291(4)	480(15)	532(7)
		Corbélia	66(19)	197(20)	177(5)	286(3)	380(5)
		Lavras	50(9)	114(11)	210(23)	231(8)	235(7)
	Individual	Araraquara	75(5)	260(1)	394(4)	648(1)	979(6)
		Corbélia	81(20)	200(3)	319(13)	419(5)	816(3)
		Lavras	45(8)	123(4)	254(12)	321(13)	567(18)
ZEA	Mistura	Araraquara	78(3)	205(4)	349(6)	525(14)	633(8)
		Corbélia	75(19)	182(24)	212(4)	344(3)	361(5)
		Lavras	43(22)	104(16)	242(22)	267(9)	283(26)
	Individual	Araraquara	51(2)	187(1)	322(16)	386(4)	607(4)
		Corbélia	53(15)	178(20)	249(12)	434(1)	347(12)
		Lavras	54(4)	151(22)	181(3)	288(5)	331(5)

Fonte: elaborada pelo autor

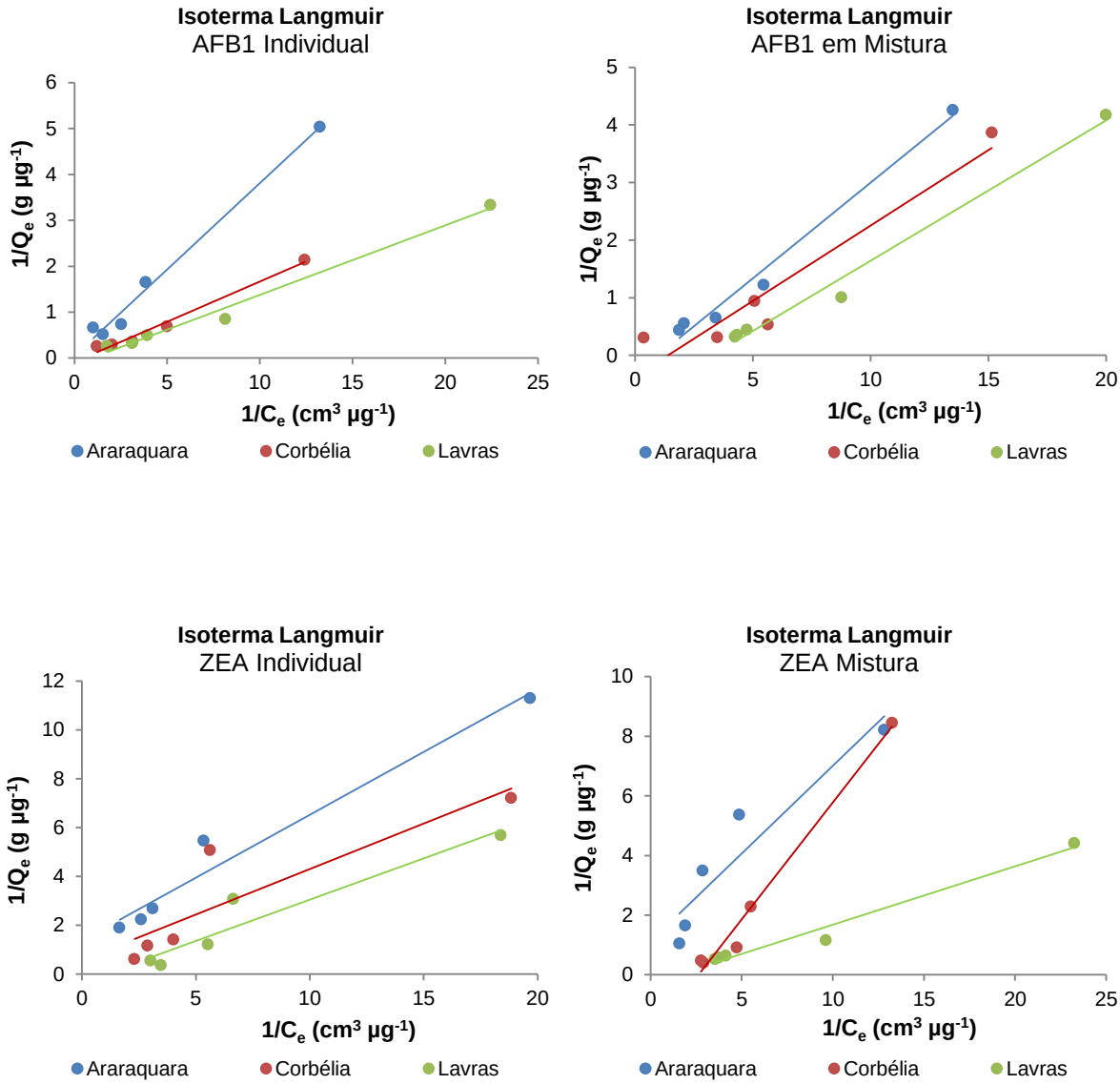
A partir dos dados da Tabela 27, foram calculadas as concentrações (no equilíbrio) das substâncias sorvidas no solo (Q_e, µg g^{-1}), que posteriormente foram utilizadas para construir as Isotermas, nos três modelos avaliados: Linear, Langmuir e Freundlich, apresentadas nas Figuras 30, 31 e 32, respectivamente. Os parâmetros encontrados para cada modelo, calculados conforme descrito no ítem 4.12, estão dispostos na Tabela 28.

Figura 30 - Aplicação do modelo de isoterma Linear, para AFB1 e ZEA, nos diferentes solos, em mistura e individualmente.



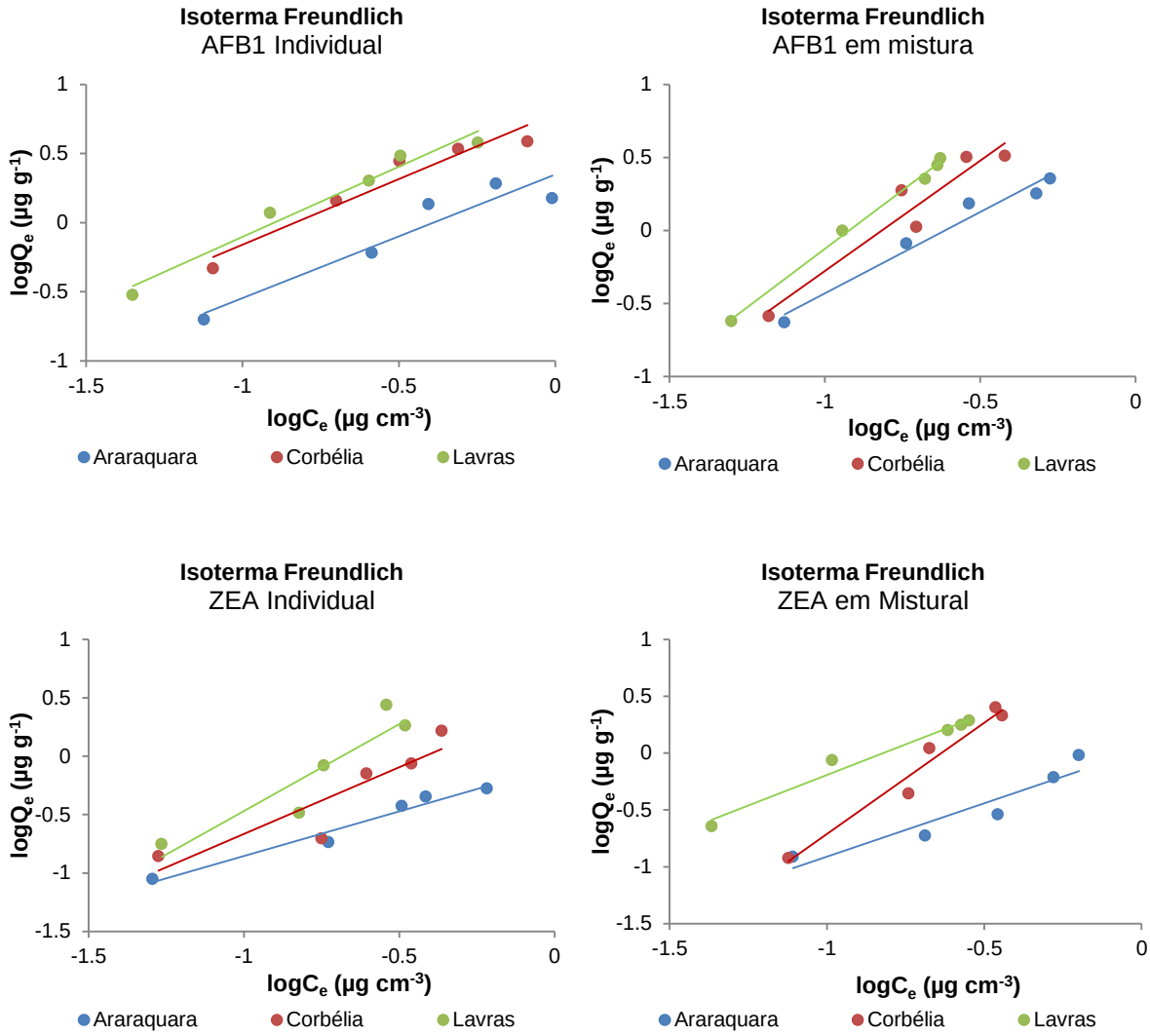
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 31 - Aplicação do modelo de isoterma de Langmuir, para AFB1 e ZEA, nos diferentes solos, em mistura e individualmente.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 32 - Aplicação do modelo de isoterma de Freundlich, para AFB1 e ZEA, nos diferentes solos, em mistura e individualmente.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 28 - Dados de sorção obtidos pelas isotermas lineares, Langmuir e Freundlich para as micotoxinas individuais e em mistura, nos três solos

Micotoxina	Ensaio	Solo	Linear			Langmuir					Freundlich		
			R^2	K_d ($cm^3\ g^{-1}$)	K_{oc} ($cm^3\ g^{-1}$)	R^2	Q_0 ($\mu g\ g^{-1}$)	b ($cm^3\ g^{-1}$)	C_0 ($\mu g\ cm^{-3}$)	R_L	R^2	K_f *	n
AFB1	Individual	Araraquara	0,64	1,59	61,11	0,99	18,92	0,14	0,11	0,98	0,90	2,23	1,12
		Corbélia	0,83	4,50	576,56	0,98	-11,50	-0,50	0,17	1,09	0,93	6,16	1,05
		Lavras	0,93	6,69	689,27	0,99	-7,10	-0,93	0,10	1,11	0,97	8,20	0,98
	Mistura	Araraquara	0,94	4,03	154,43	0,98	-3,10	-0,97	0,12	1,13	0,97	4,80	0,90
		Corbélia	0,85	10,20	1308,19	0,91	-2,74	-1,39	0,12	1,19	0,92	17,02	0,66
		Lavras	0,98	14,70	1515,72	0,99	-1,26	-3,25	0,10	1,46	1,00	29,86	0,62
ZEA	Individual	Araraquara	0,93	0,84	32,29	0,96	0,72	2,68	0,07	0,85	0,97	0,81	1,31
		Corbélia	0,87	3,85	493,87	0,78	1,71	1,57	0,08	0,89	0,82	2,99	0,88
		Lavras	0,76	8,51	876,90	0,91	-3,02	-0,98	0,09	1,10	0,86	10,47	0,67
	Mistura	Araraquara	0,90	1,46	55,76	0,88	0,90	1,90	0,10	0,84	0,88	1,07	1,06
		Corbélia	0,92	8,42	1079,23	0,98	-0,48	-2,64	0,10	1,35	0,96	17,61	0,51
		Lavras	0,98	6,55	675,23	0,98	-3,63	-1,41	0,09	1,14	0,97	7,69	0,93

*$((\mu g\ g^{-1})\ (cm^3\ g^{-1})^{1/n})$

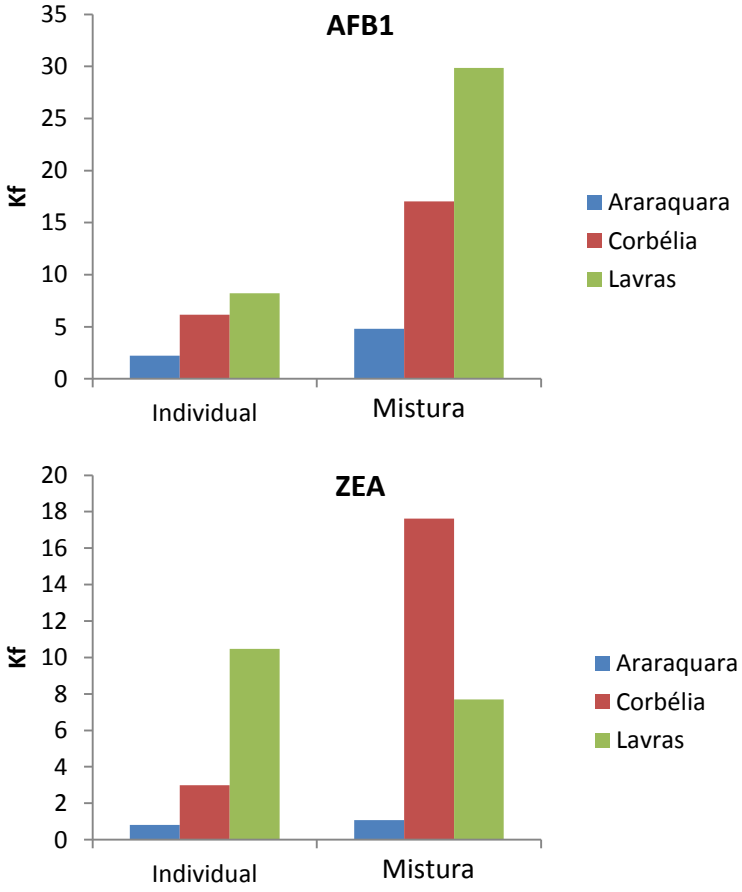
Fonte: elaborada pelo autor.

Os valores dos coeficientes de correlação variaram de 0,64 a 0,98 para as Isotermas Lineares, 0,78 a 0,99 para as isotermas de Langmuir, e 0,86 a 1,00 para as isotermas de Freundlich. Porém, o modelo de Langmuir apresentou valores negativos da constante de Langmuir (b) para a maioria dos ensaios, o que torna o modelo inadequado, mostrando que o comportamento do processo de sorção não segue as proposições nas quais o modelo de Langmuir é baseado (FUNGARO E BRUNO, 2009). Nesse sentido, o modelo de Freundlich é o mais adequado para explicar os dados obtidos experimentalmente. Mas ressalta-se que o modelo linear também apresentou boa correlação, e é importante pois fornece os valores de K_{oc}.

Quanto aos componentes do solo, que podem afetar nos processos de sorção, destacam-se os minerais, tipicamente presentes na fração argilosa do solo, que possuem a habilidade de adsorver compostos orgânicos e inorgânicos (VASSILIS et al., 2016). Além disso, a matéria orgânica possui diversos sítios que também são capazes de adsorver esses compostos. A capacidade de troca catiônica também é um indicativo para interações entre matéria inorgânica carregada e compostos orgânicos ionizados (TOLLS, 2001).

Para uma maior compreensão do processo de sorção, foram plotados 4 gráficos utilizando os valores de Kf obtidos, a fim de compararmos os tipos de solo (Figura 33) e os tratamentos utilizados (mistura ou individual – Figura 34).

Figura 33 - Comparação dos coeficientes (Kf) obtidos para os diferentes tipos de solo.



Fonte: elaborada pelo autor.

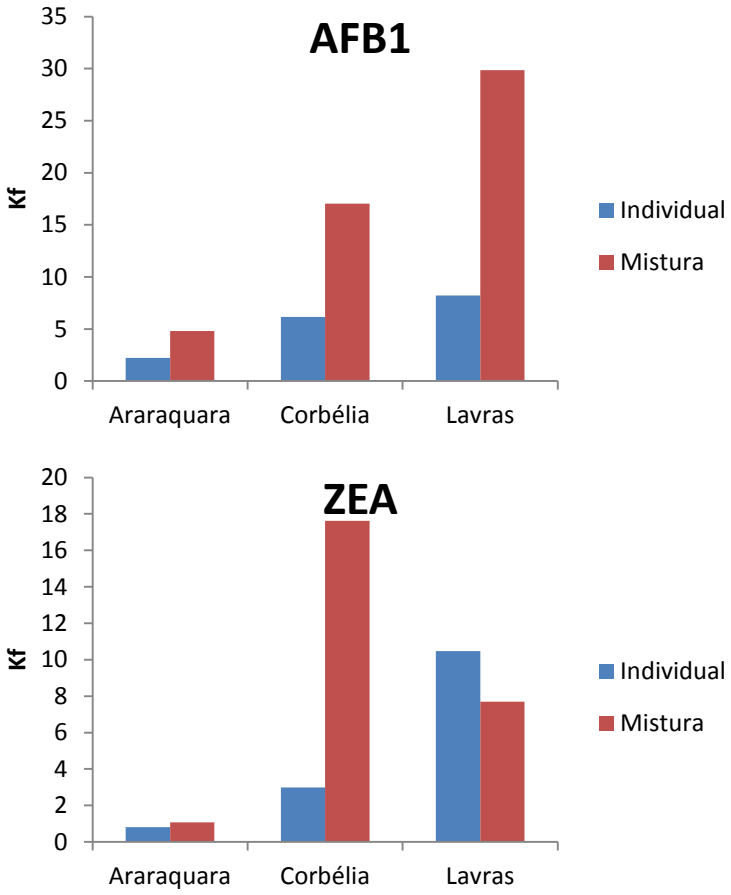
Para moléculas de baixa polaridade, e não iônicas, a interação composto/solo ocorre principalmente por interações hidrofóbicas, principalmente na matéria orgânica do solo (ZANG et al., 2014). Portanto, os coeficientes de sorção são proporcionais ao teor de matéria orgânica do solo. Para os compostos orgânicos polares, no entanto, interações composto/solo são mais complexas e ocorrem tanto na matéria orgânica, quanto na fração mineral do solo, onde podem ocorrer interações polares, como ligação de hidrogênio, ou transferência de cargas, que podem afetar de diferentes maneiras o processo de sorção (ZANG et al., 2014).

Pode-se observar que, para as duas micotoxinas, em mistura ou individual, os menores valores foram encontrados para o solo de Araraquara, o que é justificado pelos menores valores de argila e matéria orgânica (Tabela 13, página 78), mostrando que as principais interações solo/micotoxina são as hidrofóbicas. Quanto aos solos de Corbélia e Lavras, esperava-se uma maior sorção no solo de Corbélia,

que apresenta os maiores valores de argila, silte e matéria orgânica, porém, essa situação foi observada apenas para a ZEA em mistura.

Ao observarmos os principais parâmetros que pudessem influenciar na diferença de Kf observada entre os solos de Corbélia e Lavras, onde Corbélia apresentou menores coeficientes, mesmo apresentando maiores valores de matéria orgânica, argila e silte, pode-se inferir que o tipo de matéria orgânica, a qual não foi caracterizada, pode ser a responsável pelo desvio observado.

Figura 34 - Comparação dos coeficientes (Kf) obtidos para os diferentes estudos: individual ou mistura.



Fonte: elaborada pelo autor.

Para a AFB1, observa-se, claramente, o aumento dos valores das constantes para o estudo realizado em mistura. Quanto às observações para a ZEA, verifica-se que ao compararmos o tipo do estudo, apenas para o solo de Lavras a constante Kf foi menor para o estudo em mistura.

Quanto aos estudos em mistura, de forma geral (apenas com uma exceção) observou-se que presença de uma segunda micotoxina auxilia no processo de sorção, ocorrendo possivelmente um efeito sinérgico.

5.7.9 Isotermas de dessorção

As isotermas de dessorção são utilizadas para investigar se um composto é reversivelmente ou irreversivelmente sorvido no solo. Essa informação é extremamente importante uma vez que o processo de dessorção também desempenha um papel fundamental no comportamento da substância no ambiente.
O experimento foi realizado conforme descrito no fluxograma da Figura 10, nas concentrações apresentadas na Tabela 7.

Para a construção das isotermas, foram utilizadas as concentrações encontradas, no tempo de equilíbrio (48 horas) da fase aquosa (C_e, μg cm^{-3}). Os valores obtidos, com os respectivos coeficientes de variação (n=2) estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Concentrações dos analitos na fase aquosa dos experimentos de dessorção, ao atingirem o equilíbrio (48horas).

Micotoxina	Estudo	Solo	Concentração (μg L^{-1}), CV (%)				
			Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
AFB1	Individual	Araraquara	<LQ	<LQ	17(14)	34(23)	78(9)
		Corbélia	<LQ	<LQ	<LQ	25(33)	35(28)
		Lavras	<LQ	<LQ	17(25)	26(15)	30(39)
	Mistura	Araraquara	10(10)	21(1)	39(4)	47(4)	58(1)
		Corbélia	<LQ	8(12)	19(4)	21(20)	16(23)
		Lavras	9(3)	14(6)	27(8)	22(19)	28(7)
ZEA	Individual	Araraquara	<LD	18(8)	39(3)	38(10)	66(1)
		Corbélia	16(3)	20(18)	22(4)	39(6)	40(8)
		Lavras	<LD	16(5)	27(45)	19(17)	15(5)
	Mistura	Araraquara	<LD	13(26)	19(5)	21(15)	29(21)
		Corbélia	<LD	8(13)	14(8)	12(19)	13(6)
		Lavras	<LD	<LD	<LD	9(11)	<LD

LQ=5ng mL^{-1}; LD AFB1 = 3,6ng mL^{-1}; LD ZEA = 6,86ng mL^{-1}
Fonte: elaborada pelo autor.

Pode-se notar que, para a maioria dos experimentos, não foi possível quantificar as concentrações presentes nos primeiros níveis. Para os experimentos com pelo menos três concentrações quantificáveis, foram realizados os cálculos para encontrar os melhores modelos de isotermas.

A partir dos dados da Tabela 29, foram calculadas as concentrações (no equilíbrio) das substâncias dessorvidas no solo (Q_e, µg g^{-1}), que posteriormente foram utilizadas para construir as Isotermas, nos três modelos avaliados: Linear, Langmuir e Freundlich. apresentadas no Apêndice A. Os parâmetros encontrados para cada modelo, calculados conforme descrito no ítem 4.12, estão dispostos na Tabela 30.

Tabela 30 - Dados de dessorção obtidos pelas isotermas lineares, Langmuir e Freundlich para as micotoxinas individuais e em mistura, nos três solos

Micotoxina	Ensaio	Solo	Linear		Langmuir					Freundlich		
			R^2	K_d ($cm^3\ g^{-1}$)	R^2	Q_0 ($\mu g\ g^{-1}$)	b ($cm^3\ g^{-1}$)	C_0 ($\mu g\ cm^{-3}$)	R_L	R^2	K_f	n
AFB1	Individual	Araraquara	0,01	-0,81	0,14	1,82	327,91	0,11	0,03	0,02	1,87	29,15
		Lavras	0,96	137,22	0,98	-202,06	-0,62	0,10	1,07	0,97	148,79	0,96
	Mistura	Araraquara	1,00	43,45	0,97	-1,51	-12,83	0,12	-1,85	0,98	113,10	0,75
		Corbélia	0,50	144,15	0,85	4,62	44,15	0,12	0,16	0,65	155,82	0,99
		Lavras	0,81	134,53	0,93	-0,63	-34,34	0,10	-0,43	0,92	5306,54	0,49
ZEA	Individual	Araraquara	0,74	5,62	0,94	1,78	6,52	0,07	0,69	0,86	3,92	1,35
		Corbélia	0,67	55,97	0,54	-0,02	-30,81	0,08	-0,68	0,68	477696.00	0,26
		Lavras	0,21	-91,12	0,00	0,79	-2232,50	0,09	-0,01	0,06	0,04	-1,16
	Mistura	Araraquara	0,89	58,26	0,91	-0,50	-25,08	0,10	-0,65	0,88	1311,28	0,50
		Corbélia	0,24	159,60	0,67	-1,88	-36,56	0,10	-0,39	0,44	1261,26	0,66

*****(($\mu g\ g^{-1}$) ($cm^3\ g^{-1}$)$^{1/n}$)
Fonte: elaborada pelo autor.

Quanto aos modelos das Isotermas, a de Langmuir não é adequada para a representação dos dados, uma vez que apresentou, assim como nas isotermas de sorção, valores negativos de constantes (b). Quanto aos outros dois modelos, o de Freundlich apresentou valores mais adequados do coeficiente de correlação, porém, para alguns experimentos, não houve nenhum modelo adequado para representação dos dados experimentais. Portanto, dos doze experimentos realizados, foi possível encontrar os valores das constantes de dessorção apenas para os seguintes estudos: AFB1 Individual Lavras, AFB1 Mistura Araraquara e Lavras, ZEA Individual Araraquara e ZEA Mistura Araraquara.

Como na maioria dos estudos não foi possível quantificar todas as concentrações, e posteriormente, também não foi possível encontrar um modelo de isoterma compatível com os dados obtidos, sugere-se que os experimentos de isotermas de sorção/dessorção sejam repetidos, empregando-se, porém níveis maiores de concentração.

Porém, mesmo com os poucos dados obtidos neste experimento, juntamente com os valores de porcentagem de dessorção mostrados no ítem 5.7.6, infere-se que o processo de sorção das micotoxinas AFB1 e ZEA em solo não é reversível, uma vez que apresentou % dessorção bem inferiores a 75% (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000). É importante ressaltar, que a degradação dos analitos também pode ter ocasionado grande impacto neste processo.

5.7.10 Avaliação da mobilidade das micotoxinas

Os diferentes métodos utilizados para classificação das micotoxinas quanto à mobilidade, servem para compilar os dados (tempo de meia vida e constante de sorção normalizada ao carbono orgânico) obtidos nos experimentos de sorção e degradação e expressar qual o significado que esses valores podem representar quanto possíveis contaminantes de água superficial e subterrânea. A Tabela 31 apresenta os parâmetros utilizados e as classificações obtidas.

Tabela 31 - Parâmetros e classificação do potencial de mobilidade das micotoxinas.

Micotoxina	Solo	T ½ (dias)	Koc* ($cm^3\ g^{-1}$)	Solub ($\mu g\ mL^{-1}$)	DSPRU	GOSS		GUS - Potencial de lixiviação
						Potencial de transporte associado ao sedimento	Potencial de transporte dissolvido em água	
AFB1	Araraquara	7	154,43	10-30[1]	Moderadamente móvel	Baixo	Alto	1,5 - nulo
	Corbélia	10	1308,19	10-30[1]	Ligeiramente móvel	Médio	Médio	0.9 - nulo
	Lavras	5	1515,72	10-30[1]	Ligeiramente móvel	Médio	Médio	0.6 - nulo
ZEA	Araraquara	2	55,76	20[2]	Móvel	Baixo	Alto	0.7 - nulo
	Corbélia	3	1079,23	20[2]	Ligeiramente móvel	Médio	Médio	0.5 - nulo
	Lavras	1	675,23	20[2]	Ligeiramente móvel	Baixo	Alto	0,0 - nulo

* Koc utilizado referente aos experimentos em mistura, pois o teste de degradação, que resultou nos tempos de meia vida, também foi realizado em mistura.
1: AFLATOXINS, 2016; 2: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b
Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com o Diretório de Segurança de Pesticidas do Reino Unido (DSPRU), a AFB1 foi classificada como moderadamente móvel, e a ZEA como móvel para o solo de Araraquara, que possuem os menores K_{OC} e ligeiramente móveis para os solos de Corbélia e Lavras. Já o índice de GUS apresentou valores <1,8 que indicam que não há chance de ocorrer lixiviação. O terceiro método avaliado, o índice de GOSS mostrou um potencial médio de transporte associado ao sedimento para as duas micotoxinas no solo de Corbélia, e para a AFB1 em Lavras, devido aos maiores tempo de meia vida, somados ao elevado K_{OC}. Quanto ao potencial de transporte dissolvido em água, receberam a classificação alta as duas micotoxinas no solo de Araraquara e ZEA no solo de Lavras, enquanto as demais foram classificadas como médio.

No geral, cada método apresentou uma classificação, e, com exceção do índice de GUS, o solo de Araraquara, apresentou maior probabilidade de dispersão das micotoxinas.

Interessante verificar que mesmo com tempo de meia vida curto, e os solos utilizados neste trabalho apresentarem elevado teor de argila (o que levaria a uma maior sorção, e portanto, menor mobilidade das micotoxinas AFB1 e ZEA quando comparados com solos menos argilosos) ambas foram classificadas (em pelo menos um dos métodos avaliados) como possível contaminante de águas superficiais ou subterrâneas.

6 CONCLUSÕES

O trabalho apresentou um novo conceito no desenvolvimento de método cromatográfico para determinação de micotoxinas por CLAE-FLU, utilizando o solvente etanol como fase móvel, diminuindo o impacto ambiental e toxicológico gerado, quando comparado aos principais solventes utilizados em cromatografia líquida (ACN e MeOH).

Também foi possível o desenvolvimento e a validação de um método de extração baseado em uma modificação do método QuEChERS, que apresenta maior facilidade de execução que alguns métodos convencionais. O método apresentou seletividade, exatidão e precisão adequados. No processo de validação empregaram-se ferramentas estatísticas pouco utilizadas.

Quanto ao estudo de degradação, dentre os modelos cinéticos avaliados o modelo não linear de Gustafson-Holden apresentou as melhores correlações com os dados experimentais, sendo possível a determinação do tempo de meia vida (DT_{50}) onde, tem-se em ordem crescente, para as duas micotoxinas Lavras<Araraquara<Corbélia. Indicando, que os processos químicos, como sorção, juntamente com os biológicos (atividade microbiana) interferem no processo de degradação das micotoxinas.

Dos estudos que definiram a cinética de sorção, verificou-se, para todos os experimentos, uma fase inicial, de rápida sorção (até 12 horas), na qual os sítios mais acessíveis do solo são rapidamente ocupados, seguida de uma etapa mais lenta, fazendo com que as micotoxinas permaneçam por mais tempo na solução. Nessa etapa, verificou-se que os estudos em mistura apresentaram maiores valores de sorção. E quanto ao tipo de solo, tem-se em ordem crescente de sorção Araraquara≤Corbélia<Lavras.

Das isotermas avaliadas, a de Freundlich apresentou os melhores coeficientes de correlação. Porém os coeficientes do modelo Linear também foram satisfatórios, e seus valores de coeficiente de sorção normalizados ao teor de carbono orgânico do solo são imprescindíveis para a avaliação dos índices de mobilidade ambiental (DSPRU, GOSS e GUS). Foram observados os menores K_f e K_{OC} para os estudos realizados no solo de Araraquara, que é o que possui menor teor de matéria orgânica. Quanto a relação dos estudos individuais ou em mistura,

com apenas uma exceção, os estudos em mistura apresentaram maiores coeficientes, indicando que na presença de outra micotoxina, a sorção é favorecida.

Os estudos de cinética de dessorção apontaram uma dessorção discreta das micotoxinas, indicando, a princípio, que o processo de sorção não é reversível. Provavelmente, a degradação das micotoxinas, influenciou nesse processo.

Quanto à avaliação da mobilidade das micotoxinas, as diferentes classificações utilizadas apresentaram conclusões distintas, mas em alguns casos, constatou-se que há o risco de dispersão da AFB1 e ZEA para o ambiente.

7 PERSPECTIVAS PARA CONTINUIDADE DO ESTUDO

Como propostas para continuidade deste estudo elencam-se:

- ✓ Incluir a avaliação dos metabólitos das micotoxinas;
- ✓ Avaliar a persistência das micotoxinas e seus metabólitos de forma individual;
- ✓ Avaliar o comportamento de sorção das micotoxinas em diversos tipos de solos brasileiros, ampliando as diferenças nas propriedades químicas e biológicas dos solos;
- ✓ Trabalhar com maior número de níveis de concentração para a realização das isotermas de dessorção, aumentando as concentrações das micotoxinas;
- ✓ Realizar estudos de lixiviação, para avaliar o potencial de dispersão das micotoxinas e seus metabólitos;
- ✓ Avaliar como ocorre o processo de sinergia que causa o aumento da sorção das micotoxinas em misturas.

REFERÊNCIAS

AFLATOXINS. In: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A review of human carcinogens**. Lyon: IARC, 2012. p. 225-249. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 100F). Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-23.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC n.7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Seção 1, 22 fev. 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d91966804745973d9f9bdf3fbc4c6735/RDC_07_2011.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 4 mar. 2016.

AIKO, V.; MEHTA, A. Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. **Journal of Biosciences**, v. 40, n. 5, p. 943-954, 2015.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 215-222, 2002.

ALVES, G. L. O.; QUEIROZ, V. A. V.; SARAIVA, J. S. C.; FERREIRA, P.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; MARTINS, S. M.; COSTA, R. V.; SIMEONE, M. L. F. Ocorrência de zearalenona em milho armazenado por agricultores familiares da região Central de Minas Gerais. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4, 2010, Goiânia. **Resumos**... Goiânia: ABMS, 2010. 1 CD ROM.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

AMELIN, V. G.; KARASEVA, N. M.; TRET'YAKOV, A. V. Combination of the QuEChERS method with dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization in the determination of mycotoxins in grain and mixed feed by gas-liquid chromatography with an electron-capture detector. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 6, p. 552-557, 2013.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2307-2319, 2010.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BEZERRA, D. S. S. **Estrógenos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré**: ocorrência e avaliação do impacto ambiental. 2014. 196 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

BOXALL, A. B. A.; FOGG, L. A.; BAIRD, D. J.; LEWIS, C.; TELFER, T. C.; KOLPIN, D.; GRAVELL, A.; PEMBERTON, E.; BOUCARD, T. **Targeted monitoring study for veterinary medicines in the environment**. Bristol: Environment Agency. (Using science to create a better place). Disponível em: <http://cdn.environment-agency.gov.uk/scho0806blhh-e-e.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Milho**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>. Acesso em: 4 mar. 2016.

BUCHELI, T. D.; WETTSTEIN, F. E.; HARTMANN, N.; ERBS, M.; VOGELGSANG, S.; FORRER, H. R.; SCHWARZENBACH, R. P. *Fusarium mycotoxins*: overlooked aquatic micropollutants? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 1029-1034, 2008.

CASAROLI, D.; VAN LIER, Q. de J. Critérios para determinação da capacidade de vaso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 59-66, 2008.

CASTRILLÓN, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanhas do Pará. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 1/2, p. 48-56, 1988.

CHERKANI-HASSANI, A.; MOJEMMI, B.; MOUANE, N. Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: a systematic literature review, 1984-2015. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 56-69, 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006. 453 p.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006**: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. 2014. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20140701&from=EN>. Acesso em: 19 mar. 2016.

CONCEIÇÃO, R. R. P. da. **Qualidade sanitária do milho armazenado em propriedades familiares situadas na região central de Minas Gerais**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2015.

COSTAIN, R. M.; FESSER, A. C. E.; McKENZIE, D.; MIZUNO, M.; MacNEIL, J. D. Identification of hormone esters in injection site in muscle tissues by LC/MS/MS. **Food Additives and Contaminants, Part A**: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, v. 25, n. 12, p. 1520-1529, 2008.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1/3, p. 19-28, 2002.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 4/5, p. 600-609, 2010.

CUNHA, S. C.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Evaluation of the QuECHERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 4, p. 620-632, 2007.

CURTICAPEAN, A.; TOMA, F.; TARCEA, M.; CURTICAPEAN, M.; SAMARGHITAN, V.; POP, I. A.; GULEA, A. HPLC method validation for simultaneous determination of three mycotoxins from corn seeds. **Croacta Chemica Acta**, v. 84, n. 3, p. 413-417, 2011.

D'ANDRÉA, F. A.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O.; CARNEIRO, M. A. C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, p. 913-923, 2002.

DIENER, U. L.; COLE; R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S; KLICH, M. A. Epidemiology of aflatoxin formation by aspergillus flavus. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 249-270, 1987.

DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, M.; VEPRIKOVA, Z.; GODULA, M.; HAJSLOVA, J. Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. **Analytica Chimica Acta**, v. 863, n. 1, p. 29-40, 2015.

EDIAGE, E. N.; VAN POUCKE, C.; DE SAEGER, S. A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: the forgotten sample matrix. **Food Chemistry**, v. 177, p. 397-404, 2015.

EMÍDIO, E. S.; SILVA, C. P. da; MARCHI, M. R. R. Determination of estrogenic mycotoxins in environmental water samples by low-toxicity dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1391, p. 1-8, 2014.

FALLAH, A. A.; JAFARI, T.; FALLAH, A.; RAHNAMA, M. Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 1872-1875, 2009.

FREIRE, F. das C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, n. 1, p. 13-19, 2000.

FREIRE, F. das C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Documentos/Embrapa Agroindústria Tropical**, n. 110, out. 2007. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf >. Acesso em: 4 mar. 2016.

FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. C.; BRUNO, M. Aplicação de material zeolítico sintetizado de cinzas de carvão como adsorvente de poluentes em água. **Eclética Química**, v. 34, n. 1, p. 45-50, 2009.

GABER, Y.; TÖRNVALL, U.; KUMAR, M. A.; AMIN, M. A.; HATTI-KAULA, R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): a tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2021-2025, 2011.

GILES, C. H.; SMITH, D.; HUITSON, A. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 47, n. 3, p. 755-765, 1974.

GOSS, D. W. Screening procedure for soils and pesticides for potential water quality impacts. **Weed Technology**, v. 6, n. 3, p. 701-708, 1992.

GRIESSLER, K.; RODRIGUES, I.; HANDL, J.; HOFSTETTER, U. Occurrence of mycotoxins in Southern Europe. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 3, p. 301-309, 2010.

GROMADZKAA, K.; WASKIEWICZ, A.; GOLINSKI, P.; SWIETLIK, J. Occurrence of estrogenic mycotoxin - zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1051-1059, 2009.

GUSTAFSON, D. I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 339-357, 1989.

GUSTAFSON, D. I.; HOLDEN, L. R. Nonlinear pesticide dissipation in soil: a new model based on spatial variability. **Environmental Science and Technology**, v. 24, n. 7, p. 1032-1038, 1990.

HARKAI, P.; SZABÓ, I.; CSERHÁTI, M.; KRIFATON, C.; RISA, A.; RADÓ, J.; BALÁZS, A.; BERTA, K.; KRISZT, B. Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 108, p. 48-56, 2016.

HARRIS, D. Estatística. In: **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. Cap. 4, p. 72-101.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; WETTSTEIN, F. E.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, n. 1/2, p. 132-140, 2007.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; WETTSTEIN, F. E.; HOERGER, C. C.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Quantification of zearalenone in various solid agroenvironmental samples using D6-zearalenone as the internal standard. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2926-2932, 2008.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: a review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HENDERSON, R. K.; JIMENEZ-GONZALEZ, C.; CONSTABLE, D. J. C.; ALSTON, S. R.; INGLIS, G. G. A.; FISHER, G.; SHERWOOD, J.; BINKS, S, P.; CURZONS, A. D. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. **Green Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 854-862, 2011.

HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1141-1146, 2009.

HOERGER, C. C.; SCHENZEL, J.; STROBEL, B. W.; BUCHELI, T. D. Analysis of selected phytotoxins and mycotoxins in environmental samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1261-1289, 2009.

HUANG, W.; PENG, P.; YU, Z.; FU, J. Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. **Applied Geochemistry**, v. 18, n. 7, p. 955-972, 2003.

HUSSEIN, H.; BRASEL, J. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**. orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. 2010. Revisão 3. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2016.

IQBAL, S. Z.; JINAP, S.; PIROUZ, A. A.; FAIZAL, A. R. A. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 110-119, 2015.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-VI. Fumigation with carbon disulphide. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 5, p. 375-378, 1976.

JOANNIS-CASSAN, C.; TOZLOVANU,M.; HADJEBA-MEDJDOUB, K.; BALLET, N.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Binding of zearalenone, aflatoxin B1, and ochratoxin A by yeast-based products: a method for quantification of adsorption performance. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 7, p. 1175-1185, 2011.

KENSLER, T. W.; ROEBUCK, B. D.; WOGAN, G. N.; GROOPMAN, J. P. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p. 28-48, 2011.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. **Food Chemistry**, v. 153, p. 44-51, 2014.

KOLPIN, D. W.; SCHENZEL, J.; MEYER, M. T.; PHILLIPS, P. J.; HUBBARD, L. E.; SCOTT, T. M.; BUCHELI, T. D. Mycotoxins: diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. **Science of the Total Environment**, v. 470/471, p. 669-676, 2014.

KWAŚNIEWSKA, K.; GADZAŁA-KOPCIUCH, R.; CENDROWSKI, K. Analytical procedure for the determination of zearalenone in environmental and biological samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 119-130, 2015.

LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, n. 1, p. 79-88, 2004.

LAI, X. W.; SUN, D. L.; RUAN, C. Q.; ZHANG, H.; LIU, C. L. Rapid analysis of aflatoxins B1, B2, and ochratoxin A in rice samples using dispersive liquid – liquid microextraction combined with HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 92-98, 2013.

LANDAU, E. C.; SANS, L. M. A; SANTANA, D. P. Cultivo do milho: clima e solo. **Sistemas de Produção/Embrapa Milho e Sorgo**, n. 2, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/climaesolo.htm>. Acesso em: 4 mar. 2016.

LANIER, C.; HEUTTE, N.; RICHARD, E.; BOUCHART, V.; LEBAILLY, P.; GARON, D. Mycoflora and mycotoxin production in oilseed cakes during farm storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1640-1645, 2009.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.

LOURENCETTI, C.; MARCHI, M. R. R.; RIBEIRO, M. L. Influence of sugar cane vinasse on the sorption and degradation of herbicides in soil under controlled conditions. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v. 47, p. 949-958, 2012.

LOURENCETTI, C.; SPADOTTO, C. A.; SANTIAGO-SILVA, M.; RIBEIRO, M. L. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas : comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pesticidas**: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 15, p. 1-14, 2005.

LUCHESE, E. B.; FAVERO, E. B.; LENZI, E. Parte prática. In: _____. **Fundamentos da química do solo**. Rio de Janeiro: Freitas e Bastos, 2001. Cap. 9, p. 128-131.

MADDEN, U. A.; STAHR, H. M. Preliminary determination of mycotoxin binding to soil when leaching through soil with water. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 31, n. 4, p. 265-275, 1993.

MARROQUÍN-CARDONA, A. G.; JOHNSON, N. M.; PHILLIPS, T. D.; HAYES, A. W. Mycotoxins in a changing global environment - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220-230, 2014.

MASSART, F.; MEUCCI, V.; SAGESE, G.; SOLDANI, G. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. **Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 5, p. 690-695, 2008.

METZLER, M.; PFEIFFER, E.; HILDEBRAND, A. A. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 4, p. 385-401, 2010.

MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 220-226, 2009.

MORTENSEN, G. K.; STROBEL, B. W.; HANSEN, H. C. B. Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. **Chemosphere**, v. 62, n. 10, p. 1673-1680, 2006.

MORTENSEN, G. K.; STROBEL, B. W.; HANSEN, H. C. B. Determination of zearalenone and ochratoxin a in soil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 1, p. 98-101, 2003.

NATIONAL GRAIN AND FEED ASSOCIATION. **FDA mycotoxin regulatory guidance**: a guide for grain elevators, feed manufacturers, grain processors and exporters. Washington, DC, 2011. Disponível em: <https://www.ngfa.org/wp-content/uploads/NGFAComplianceGuide-FDARegulatoryGuidanceforMycotoxins8-2011.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2016.

NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test nº 106: adsorption - desorption using a batch equilibrium method. In:_____. **OECD guidelines for the testing of chemicals, section 1**. Paris, 2000. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9710601e.pdf?expires=1457137477&id=id&accname=guest&checksum=F2F4B34232B1F1A65064E5194AEB0345>. Acesso em: 4 mar. 2016.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test nº 307: aerobic and anaerobic transformation in soil. In:_____. **OECD guidelines for the testing of chemicals, section 1**. Paris, 2002. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9730701e.pdf?expires=1457137611&id=id&accname=guest&checksum=5843E99F8220C77B7CE3579040417497>. Acesso em: 4 mar. 2016.

OSAGIE, E. I.; OWABOR, C. N. Adsorption of naphthalene on clay and sandy soil from aqueous solution. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v. 5, p. 345-351, 2015.

PATERSON, R. R. M.; KELLEY, J.; GALLAGHER, M. Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (Link) in water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 435-436, 1997.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, p. 754-766, 1999.

PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L.; CHAIN, A.; SCRAMIN, S. Manual do usuário do programa AGROSCRE: apoio à avaliação de tendências de transporte de princípios ativos de agrotóxicos. **Documentos/Embrapa Meio Ambiente**, n. 61, 2004. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/15747/4/documentos61.pdf >. Acesso em: 4 mar. 2016.

PINTO, C. G.; LAESPADA, M. E. F.; MARTIN, S. H.; FERREIRA, A. M. C.; PAVON, J. L. P.; CORDERO, B. M. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta**, v. 81, n. 1/2, p. 385-391, 2010.

POLIAKOFF, M.; LICENCE, P. Green chemistry. **Nature**, v. 450, p. 810-812, 2007.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1-15, 2009.

RAHMAN, A.; JINAP, S. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. **Food Additives & Contaminants, Part A**: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, v. 27, n. 12, p. 1683-1693, 2010.

RASMUSSEN, R. R.; STORM, I. M. L. D.; RASMUSSEN, P. H.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K. F. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 2, p. 765-776, 2010.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C. Biomassa microbiana do solo. **Documentos/Embrapa Cerrados**, n. 205, 2007. Disponível em: <www.cpac.embrapa.br/download/1292/t>. Acesso em: 4 mar. 2016.

RIBEIRO, C.; TIRITAN, M. E. Development and validation of a gas chromatography mass spectrometry method for the analysis of phytoestrogens, phytosterols and mycotoxins in estuarine water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 187-202, 2015.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. do R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.

SCHENZEL, J.; HUNGERBÜHLER, K.; BUCHELI, T. D. Mycotoxins in the environment: II. Occurrence and origin in Swiss river waters. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 24, p. 13076-13084, 2012.

SCHENZEL, J.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Multi-residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11207-11217, 2010.

SEELING, K.; DANICKE, K. H.; UEBERSCHAR, P.; LEBZIEN, P.; FLACHOWSKY, G. On the effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 9, p. 847-855, 2005.

SELVARAJ, J. N.; ZHOU, L.; WANG, Y.; ZHAO, Y.-J.; XING, F.-G.; DAI, X.-F.; LIU, Y. Mycotoxin detection - recent trends at global level. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 11, p. 2265-2281, 2015.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FLD). **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1807-1813, 2011.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1/2, p. 23-35, 2005.

SWARCEWICZ, M. K.; GREGORCZYK, A. Atrazine degradation in soil: effects of adjuvants and a comparison of three mathematical models. **Pest Management Science**, v. 69, n. 12, p. 1346-1350, 2013.

TAMURA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 6, p. 629-635, 2011.

TANG, T.; SHI, T.; LI, D.; XIA, J.; HU, Q.; CAO, Y. Adsorption properties and degradation dynamics of endocrine-disrupting chemical levonorgestrel in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 3999-4004, 2012.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. 433 p.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOAN, V. D.; TAO, V. D.; WAKLER, J.; HA, C. T. Residue, temporal trend and half-life time of selected organochlorine pesticides (OCPs) in surface soils from Bacninh, Vietnam. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 4, p. 516-521, 2009.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, 2001.

TURNER, N. W.; BRAMHMBHATT, H.; SZABO-VEZSE, M.; POMA, A.; COKER, R.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: an update (2009-2014). **Analytica Chimica Acta**, v. 901, p. 12-33, 2015.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 147-157, 2007.

VASSILIS, L. D.; GEORGE, B. C.; CHARALAMPOS, P. G.; ATHINA, P.; XANTHIPPOS, K. N. Mobility of pharmaceutical compounds in the terrestrial environment: adsorption kinetics of the macrocyclic lactone eprinomectin in soils. **Chemosphere**, v. 144, p. 1201-1206, 2016.

WILLIAMS, L. D.; BACON, C. W.; MEREDITH, F. I.; FRANZLUEBBERRS, A. J.; WYATT, R. D.; SMITH, M. A.; RILEY, R. T. Leaching and binding of fumonisins in soil microcosms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 685-690, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Mycotoxins. In: _____. **Some naturally occurring substances**: food items and constituents,heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARCPress, 1992. p. 245-521. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 56). Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56-15.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon: IARCPress, 2002. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 82). Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2016.

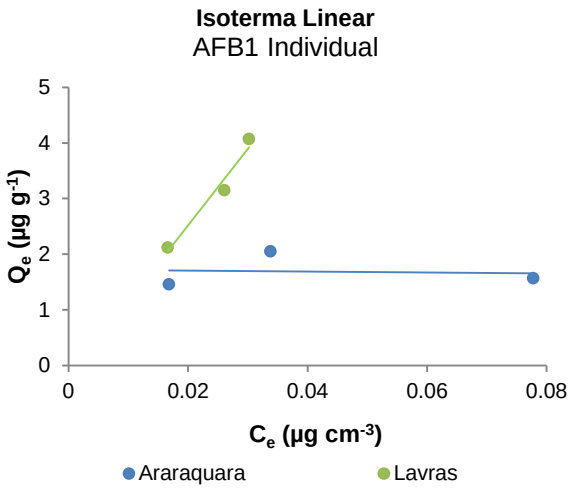
YOGENDRARAJAH, P.; VAN POUCKE, C.; DE MEULENAER, B.; DE SAEGER, S. Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices. **Journal of Chromatography A**, v. 1297, p. 1-11, 2013.

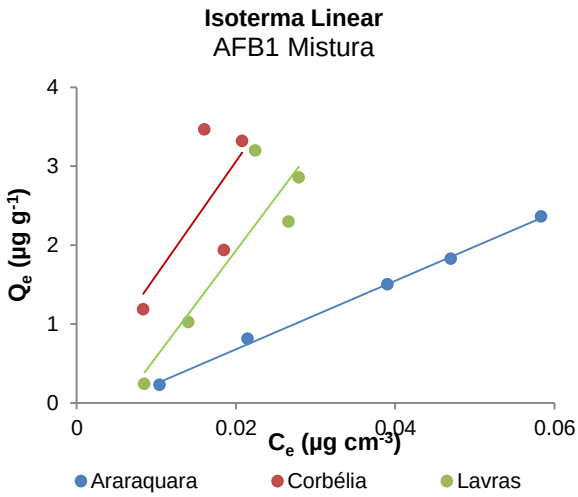
ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

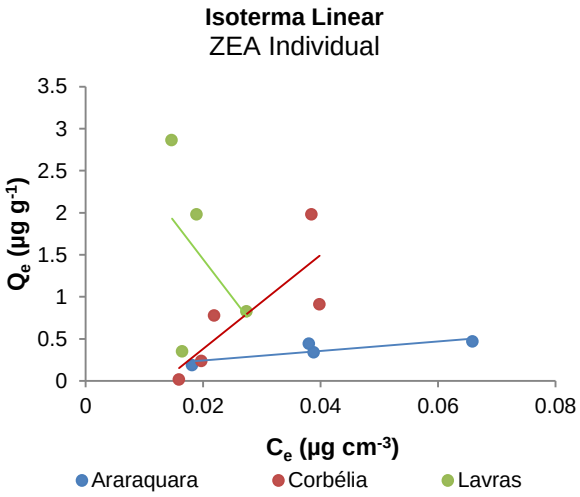
ZHANG, A.; HOU, L.; ZHU, D.; CHEN, W. Synergistic role of different soil components in slow sorption kinetics of polar organic contaminants. **Environmental Pollution**, v. 184, p. 123-130, 2014.

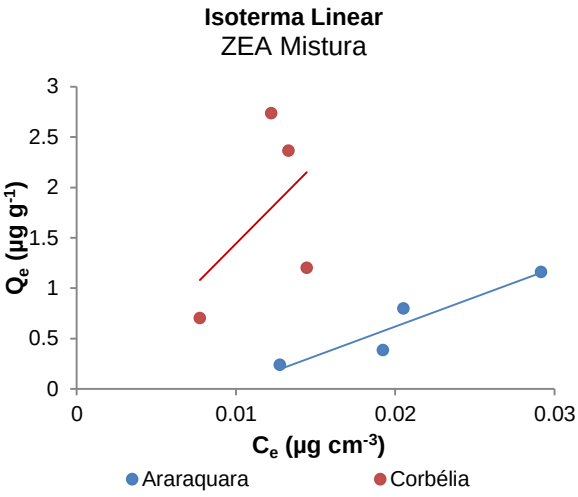
APÊNDICE A

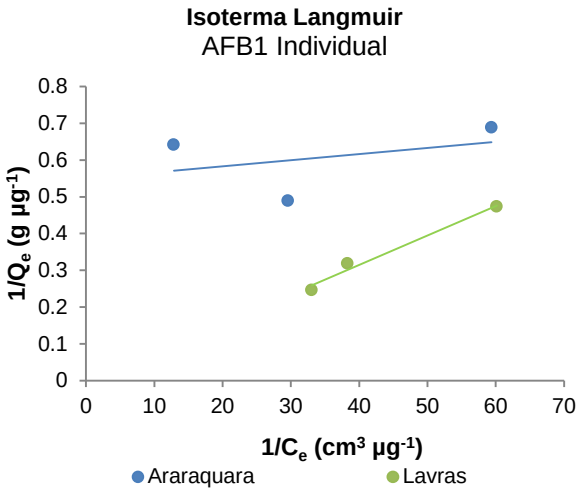
Isotermas de dessorção (Linear, Langmuir e Freundlich) das micotoxinas individuais e em mistura, para os três tipos de solo.

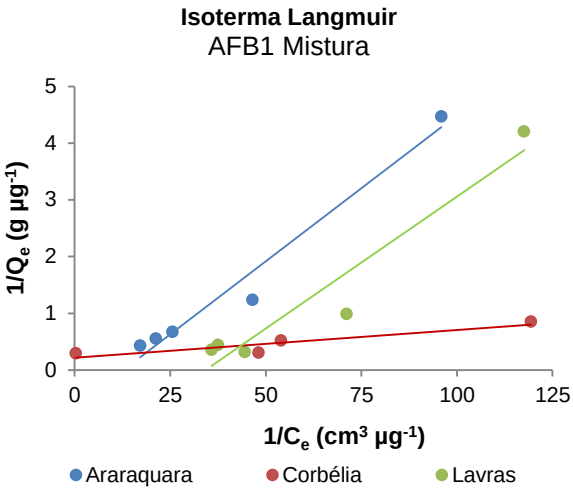


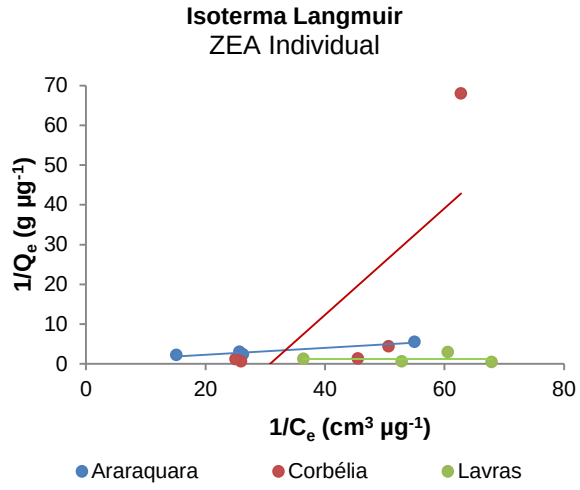


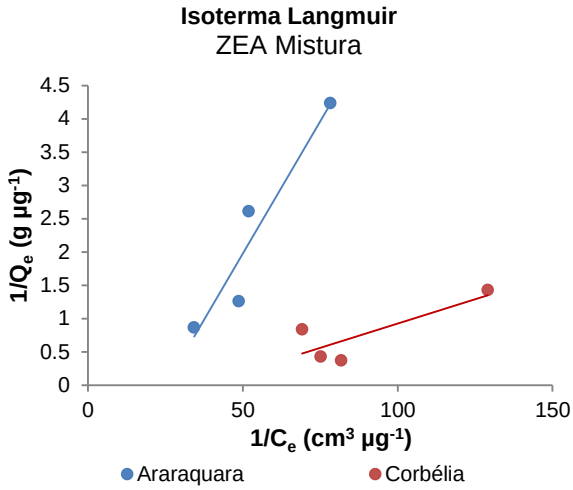


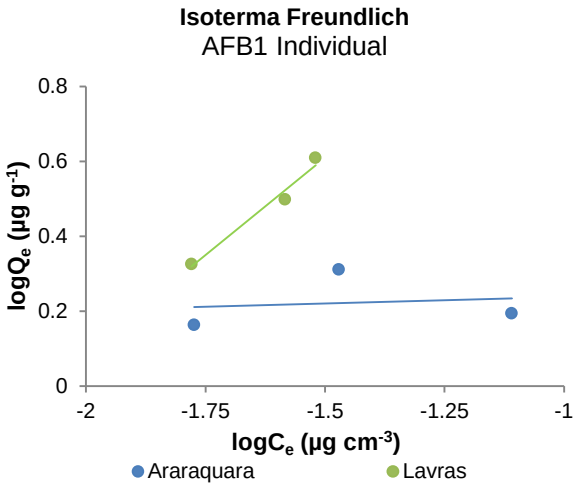


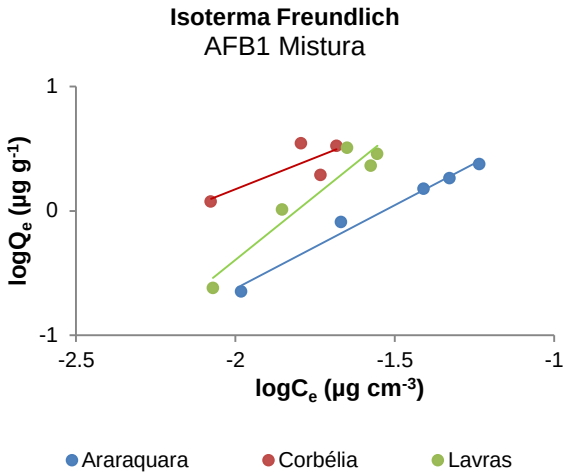

Isoterma Langmuir
AFB1 Individual
1/Qe (g µg-1)
1/Ce (cm3 µg-1)
Araraquara
Lavras

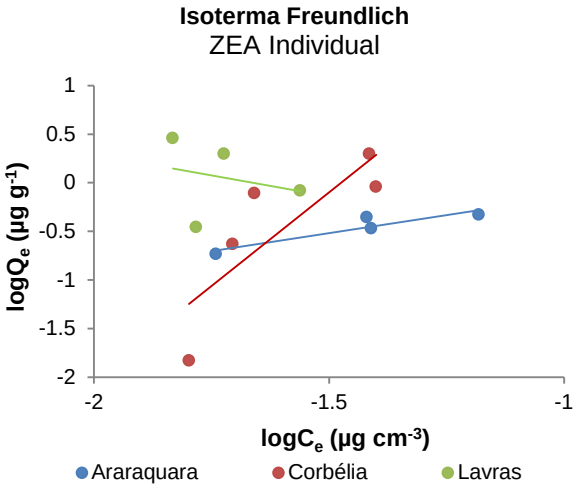

Isoterma Langmuir
AFB1 Mistura
1/Qe (g µg-1)
1/Ce (cm3 µg-1)
Araraquara
Corbélia
Lavras

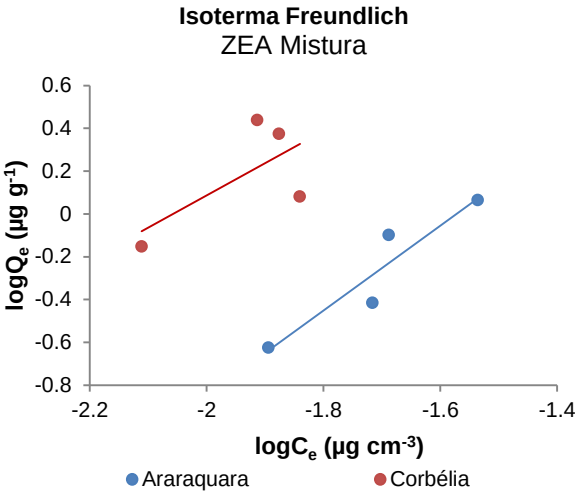

Isoterma Langmuir
ZEA Individual
1/Qe (g µg-1)
1/Ce (cm3 µg-1)
Araraquara
Corbélia
Lavras


Isoterma Langmuir
ZEA Mistura
1/Qe (g µg-1)
1/Ce (cm3 µg-1)
Araraquara
Corbélia


Isoterma Freundlich
AFB1 Individual
0.8
0.6
0.4
0.2
0
logQe (µg g-1)
-2
-1.75
-1.5
-1.25
-1
logCe (µg cm-3)
Araraquara
Lavras


Isoterma Freundlich
AFB1 Mistura
1
0
-1
logQe (µg g-1)
-2.5
-2
-1.5
-1
logCe (µg cm-3)
Araraquara
Corbélia
Lavras


Isoterma Freundlich
ZEA Individual
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
logQe (µg g-1)
-2
-1.5
-1
logCe (µg cm-3)
Araraquara
Corbélia
Lavras


Isoterma Freundlich
ZEA Mistura
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
logQe (µg g-1)
-2.2
-2
-1.8
-1.6
-1.4
logCe (µg cm-3)
Araraquara
Corbélia