

TAMARA DAIANE DE SOUZA

**REMOÇÃO DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM SISTEMAS ALAGADOS  
CONSTRUÍDOS CULTIVADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S729r  
2013

Souza, Tamara Daiane de, 1988-

Remoção do inseticida clorpirifós em sistemas alagados  
construídos cultivados com diferentes espécies vegetais /  
Tamara Daiane de Souza. – Viçosa, MG, 2013.  
xvi, 72 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Alisson Carraro Borges.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Pesticidas - Aspectos ambientais. 2. Biorremediação.  
3. Biodegradação. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 632.95

TAMARA DAIANE DE SOUZA

**REMOÇÃO DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM SISTEMAS ALAGADOS  
CONSTRUÍDOS CULTIVADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de março de 2013.

---

Renato Ribeiro Siman

---

Maria Eliana Lopes Ribeiro de  
Queiroz

---

Antonio Teixeira de Matos  
(Coorientador)

---

Alisson Carraro Borges  
(Orientador)

À Deus,  
Aos meus pais Paulo e Rosemeire,  
Aos meus irmãos Wildmarch e Gabriel,  
Às minhas sobrinhas Duda e Jéssica,  
Ao Múcio,

*Pelo amor e apoio incondicionais,  
Dedico e ofereço este trabalho.*

*“Quem deseja ver o arco-íris, precisa aprender a gostar da chuva”*

*Paulo Coelho*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua presença constante em minha vida e pela força concedida.

A Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Engenharia Agrícola, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Ao professor Alisson Carraro Borges, pela orientação, confiança e conhecimentos transmitidos.

Ao coorientador Antonio Teixeira de Matos, pelas sugestões, conselhos e ensinamentos.

A professora Ann Honor Munteer, pela coorientação e auxílio no trabalho. Por disponibilizar com tanta cordialidade o uso Laboratório de Ecotoxicologia. Neste, agradeço em especial a estudante Eduarda Oliveira Reis, por toda ajuda nos testes de ecotoxicidade, essenciais na realização deste trabalho.

A professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e a toda equipe do Laboratório de Química Analítica (LAQUA-UFV), em especial, a Fernanda Heleno, pelo fornecimento de infraestrutura e imenso auxílio nas análises cromatográficas.

A professora Paola Alfonsa Vieira Lo Monaco, por suas valiosas sugestões na elaboração do trabalho e amizade.

Ao Múcio, pela imensurável ajuda em todas as etapas deste trabalho, pela companhia e por me acalmar nos momentos de dificuldade.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Qualidade Ambiental (GPQA) pelo apoio e amizade. Em especial, agradeço a Gheila, Isabela, Júnior, Magno e Marta, pela contribuição no experimento.

Aos funcionários Simão, Mazinho e Zé, pela prontidão em me auxiliar sempre que necessário.

Aos meus pais, Paulo Roberto e Rosemeire, por serem os meus maiores incentivadores em tudo que tenho realizado, pelo zelo e amor incondicionais.

Aos amigos e familiares, em especial, aos meus irmãos e sobrinhas, Widmarch, Gabriel, Duda e Jéssica, pelo incentivo, torcida e por compreenderem minha ausência em diversos momentos.

## CONTEÚDO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
1.1. Introdução geral.....	1
1.2. Objetivos.....	4
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INSETICIDAS.....</b>	<b>8</b>
1.1. Inseticidas organofosforados .....	9
1.2. O clorpirifós.....	10
<b>2. CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS COM PESTICIDAS 15</b>	
2.1. Avaliação do potencial de contaminação.....	15
2.2. Pesticidas em águas.....	18
<b>3. SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS .....</b>	<b>21</b>
3.1. Plantas utilizadas em SACs .....	22
3.1.1. Erva de bicho .....	24
3.1.2. <i>Mentha aquatica</i> .....	25
3.1.3. Capim tifton 85 .....	26
3.2. Sistemas alagados construídos na remoção de pesticidas .....	26
<b>4. ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>

<b>CAPÍTULO 2: ARTIGO TÉCNICO-CIENTÍFICO .....</b>	<b>40</b>
<b>REMOÇÃO DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS CULTIVADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>40</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>41</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
2.1. Configuração dos sistemas alagados construídos de escoamento subsuperficial horizontal .....	45
2.2. Operação do sistema .....	46
2.3. Extração e quantificação do inseticida clorpirifós.....	47
2.3.1. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura... 47	
2.3.2. Quantificação por cromatografia gasosa.....	48
2.4. Ensaio ecotoxicológico .....	48
2.5. Análise estatística da remoção do clorpirifós.....	50
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
3.1. Remoção do clorpirifós .....	51
3.2. Ensaio de toxicidade .....	61
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1: Revisão de Literatura

Figura 1. Estrutura química do clorpirifós.....	11
Figura 2. Rota de biodegradação do clorpirifós .....	14
Figura 3. Eletromicrografia de varredura das seções transversais da raíz (a) e lâmina foliar (b) de erva-de-bicho submetida ao alagamento.....	24
Figura 4. Organismo-teste <i>Daphnia</i> sp. fêmea adulta.....	30

### Capítulo 2: Remoção do inseticida clorpirifós em sistemas alagados construídos cultivados com diferentes espécies vegetais

Figura 1. Cromatogramas da análise do clorpirifós na água afluyente aos SACs e em amostras (a) acima do limite de detecção e (b) abaixo do limite de detecção. ....	52
Figura 2. Potencial hidrogeniônico médio nos SACs ao longo dos TRHs estudados. ....	56
Figura 3. Temperatura externa do ar ao longo do experimento .....	57
Figura 4. Sistemas alagados construídos após o início dos tratamentos (a) SAC <sub>M</sub> cultivado com menta; (b) SAC <sub>E</sub> cultivado com erva de bicho; (c) SAC <sub>T</sub> cultivado com capim tifton 85 e (d) SAC <sub>C</sub> sem vegetação. ....	60
Figura 5. Resultados médios do teste de toxicidade das amostras após tratamento nos SACs, em que * representa diferença significativa com o controle (p<0,05), caracterizando estas amostras como tóxicas. (a) SAC cultivado com capim tifton 85; (b) SAC cultivado	

com menta; (c) SAC cultivado com erva de bicho e (d) SAC sem  
vegetação. .... 63

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1: Revisão de Literatura

Tabela 1. Classificação toxicológica dos inseticidas de acordo com o Ministério da Saúde. ....	10
Tabela 2. Propriedades físicas e químicas do clorpirifós. ....	12
Tabela 3. Método de GOSS para avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais. ....	17
Tabela 4. Propriedades físicas e químicas a 20-25 °C de alguns pesticidas. ....	18
Tabela 5. Resultados experimentais obtidos em SACs na remediação de águas contendo pesticidas.....	28

### Capítulo 2: Remoção do inseticida clorpirifós em sistemas alagados construídos cultivados com diferentes espécies vegetais

Tabela 1. Análise de variância.....	52
Tabela 2. Eficiência de remoção do clorpirifós (%) nos tempos de retenção hidráulica.....	53

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação brasileira de normas técnicas
ARL	Água residuária da indústria de laticínio
ARS	Água residuária de suinocultura
CEE	Comunidade econômica europeia
CL50	Concentração letal mediana
D <sub>10</sub>	Diâmetro correspondente a 10% do material que passa, tomado na curva granulométrica
D <sub>60</sub>	Diâmetro correspondente a 60% do material que passa, tomado na curva granulométrica
DBC	Delineamento em blocos casualizados
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DL <sub>50</sub>	Dose letal mediana
DT <sub>50</sub>	Tempo de meia-vida
ECD	Detector por captura de elétrons
EEA	European environment agency
ELL-PBT	Extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura
EPA	Environmental protection agency
GUS	Groundwater ubiquity score
K <sub>H</sub>	Constante da lei de Henry
K <sub>oc</sub>	Coeficiente de adsorção à matéria orgânica
K <sub>ow</sub>	Coeficiente de partição octanol/água
ns	Não significativo a 5% de probabilidade
PEAD	Polietileno de alta densidade
pH	Potencial hidrogeniônico

POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PV	Pressão de vapor
SACs	Sistemas alagados construídos
SAC <sub>C</sub>	SAC sem vegetação
SAC <sub>E</sub>	SAC cultivado com erva de bicho
SAC <sub>M</sub>	SAC cultivado com menta
SAC <sub>T</sub>	SAC cultivado com capim tifton 85
SAC-EHSS	Sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial
TCP	3,5,6-tricloro-2-piridinol
TMP	3,5,6-tricloro-2 metoxipiridina
TRH	Tempo de retenção hidráulica
*	Não significativo a 5% de probabilidade

## RESUMO

SOUZA, Tamara Daiane de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Remoção do inseticida clorpirifós em sistemas alagados construídos cultivados com diferentes espécies vegetais.** Orientador: Alisson Carraro Borges. Coorientadores: Ann Honor Mounteer e Antonio Teixeira de Matos.

Nas últimas décadas, tem-se constatado alto índice de contaminação dos recursos hídricos com substâncias oriundas de áreas agrícolas. Neste contexto, destacam-se os inseticidas organofosforados, que oferecem elevado risco para abastecimento público, dessedentação de animais e preservação da flora e fauna aquática. O clorpirifós, incluído nesta classe, é um inseticida amplamente utilizado no mundo e está entre os mais utilizados no Brasil. Face aos danos causados por estas substâncias quando alcançam corpos hídricos, somado à dificuldade de remediação destes ambientes, torna-se essencial o conhecimento de técnicas capazes de minimizar tal processo. Os Sistemas Alagados Construídos (SACs) mostram-se como uma alternativa, tendo sido evidenciado em alguns experimentos sua capacidade de remover contaminantes recalcitrantes, como os pesticidas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade de remediação de água contaminada com o inseticida clorpirifós, por meio de sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial, em que foram cultivados diferentes macrófitas. Mensurou-se a redução da concentração do clorpirifós bem como a redução da toxicidade nos tempos de retenção hidráulica de 24, 48, 96, 144 e 192 h. O experimento foi composto por quatro SACs construídos em escala piloto: SAC<sub>C</sub> sem vegetação; SAC<sub>T</sub> cultivado com capim tifton 85 (*Cynodon* spp.); SAC<sub>M</sub> cultivado com *Mentha aquatica* e SAC<sub>E</sub> cultivado com Erva de bicho (*Polygonum punctatum*). A concentração inicial de clorpirifós aplicada em todos os SACs foi de 1 mg L<sup>-1</sup>. Antes do início dos tratamentos, aplicou-se esgoto sanitário diluído para inserção do biofilme no sistema. Para realização do teste ecotoxicológico agudo qualitativo, utilizou-se a espécie *Daphnia similis*. A análise de variância demonstrou que não houve diferença estatística significativa, em nível de 5% de probabilidade, na remoção do clorpirifós entre os SACs estudados e ao

longo dos tempos de retenção hidráulica. Observou-se pelas análises cromatográficas alta eficiência na remoção do inseticida, com média geral de 98,6%, sendo que já no primeiro tempo de retenção hidráulica, 24 h, houve remoção do clorpirifós para valores inferiores ao limite de detecção do CG, implicando em uma eficiência maior que 99% para os sistemas SAC<sub>C</sub>, SAC<sub>M</sub>, SAC<sub>E</sub> e SAC<sub>T</sub>. Tal resultado é atribuído principalmente aos processos de adsorção e degradação microbiana. Para os ensaios padronizados qualitativos de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, de forma semelhante aos resultados de eficiência de remoção do clorpirifós, observou-se para a maioria das amostras a redução de toxicidade acima de 80%. Constatou-se que os testes ecotoxicológicos com os efluentes dos sistemas alagados construídos estudados são uma boa opção como indicativo da eficiência dos tratamentos e uma promissora alternativa na complementação de análises físicas e químicas.

## ABSTRACT

SOUZA, Tamara Daiane de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Removing chlorpyrifos insecticide in constructed wetlands cultivated with different plant species.** Adviser: Alisson Carraro Borges. Co-Advisers: Ann Honor Munteer and Antonio Teixeira de Matos.

Over the last decades, it has been found high levels of water contamination with substances derived from agricultural areas. In this context, we highlight the organophosphate insecticides, which offer high risk to public drinking, watering livestock and preservation of aquatic flora and fauna. Chlorpyrifos, included in this class, is a widely used insecticide in the world and is among the most used in Brazil. Given the damage caused by these substances when they reach water bodies, plus the difficulty of remediation of these environments, it is essential to know techniques to minimize this process. The constructed wetlands (CWs) are shown as an alternative, and some experiments have demonstrated their ability to remove recalcitrant contaminants such as pesticides. The objective of this research was to evaluate the ability of remediation of water contaminated with the insecticide chlorpyrifos through horizontal subsurface flow constructed wetlands planted with different macrophytes. It was measured the reduction of the chlorpyrifos concentration and the reduction of toxicity over hydraulic retention times of 24, 48, 96, 144 and 192 h. The experiment consisted in four pilot scale CWs:  $CW_C$  without vegetation;  $CW_T$  cultivated with Tifton 85 (*Cynodon* spp.);  $CW_M$  cultivated with *Mentha aquatic* and  $CW_E$  cultivated with dotted knotweed (*Polygonum punctatum*). The initial concentration of chlorpyrifos applied in all CWs was  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . Before beginning the treatments, it was applied diluted sewage for biofilm insertion on the systems. For execution of quality ecotoxicological acute tests, it was used the specie *Daphnia similis*. The analysis of variance showed there was no statistical difference, at the 5% level of probability, in the removal of chlorpyrifos between the studied CWs and over the hydraulic retention times. There was a great efficiency in removing pesticide, with overall average of 98.6%, whereas in the first hydraulic retention time, 24 h, there was removal of chlorpyrifos to below the limit of detection, implying at efficiency greater than 99% for the  $CW_C$ ,  $CW_M$ ,

$CW_E$  and  $CW_T$ . This result is mainly attributed to adsorption and microbial degradation. For standard acute toxicity tests with *Daphnia similis*, in accordance with results from removal efficiency of chlorpyrifos, for most samples there was a reduction in toxicity above 80%. Ecotoxicological tests with effluents of constructed wetland systems studied are a good choice as an indicator of the effectiveness of treatments and a promising alternative to complement the physical and chemical analyzes.

# 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1. Introdução geral

Nas últimas décadas, tem-se constatado alto índice de contaminação dos recursos hídricos com substâncias oriundas de áreas agrícolas. Neste contexto, destacam-se os pesticidas<sup>1</sup>, uma classe de compostos que, apesar de seus evidentes benefícios para a agricultura, oferecem alto risco ao ecossistema e à saúde humana. Dentre os produtos agrícolas englobados pelos pesticidas, encontram-se os inseticidas, definidos como toda substância ou mistura de substâncias utilizadas com a finalidade de prevenir ou minimizar o aparecimento, destruir e repelir insetos e ácaros, bem como larvas e outras formas de seu desenvolvimento (Mídio e Silva, 1995).

Uma vez aplicados em uma área, os inseticidas tenderão a se difundir pelos diferentes elementos ambientais (água, solo, sedimento, ar e biota), de acordo com suas propriedades físicas e químicas, além de características do meio, tais como coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, meia-vida no solo e na água, declividade, tipo de solo da área em que foi aplicado, regime hidrológico, velocidade e direção dos ventos no local, entre outros (Poissant et al., 2008). Outra forma de contaminação é a emissão de efluentes oriundos de indústrias fabricantes de defensivos agrícolas. Estes se constituem em risco permanente, pois, além dos despejos normalmente gerados, existem reais possibilidades de descargas acidentais do processo industrial e problemas operacionais nas estações de tratamento.

Entre os diferentes elementos ambientais, os recursos hídricos têm sido tema de maior quantidade de estudos associados à contaminação com pesticidas no geral, devido à grande preocupação em relação à qualidade da água para abastecimento público, dessedentação de animais e preservação da flora e fauna aquática. Em particular, os inseticidas trazem diversos

---

<sup>1</sup> Optou-se neste trabalho o uso da denominação “pesticida” por estar fortemente consolidada no Brasil e amplamente empregada em todos os ramos que o utilizam. Vale ressaltar que a legislação brasileira, por meio do Decreto 4.074/02, trata esse grupo de produtos químicos como agrotóxicos.

malefícios quando presentes em águas naturais, destacando-se os potenciais danos à saúde humana, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso, intoxicação, ter ação imunodepressora, ser cancerígeno, mutagênico, entre outros.

Dentre a vasta gama de inseticidas atualmente em uso, destaca-se o clorpirifós (*O,O*-dietil *O*-3,5,6-trichloropiridin-2-yl fosforotioato), que, segundo Guilherme et al. (2000), está dentre os mais utilizados no Brasil. Ele é um composto organofosforado que atua como inseticida e acaricida, amplamente aplicado por meio de quimigação, recomendado para o controle de diversas pragas (moscas, lagartas, ácaros e pulgões, por exemplo) que atacam grande número de culturas no Brasil. Como organofosforado, pode ser absorvido pelo organismo humano via pele, trato gastrointestinal, por via respiratória e via membranas mucosas. Seu risco para a saúde humana é o fato de atuar como inibidor de enzimas (colinesterase), causando síndrome colinérgica, sendo, portanto, neurotóxico (Pena et al., 2003). Por estas razões existe grande preocupação com relação à contaminação de corpos hídricos com este composto.

Face aos numerosos danos causados por inseticidas organofosforados, especialmente o clorpirifós, quando alcançam corpos hídricos, somado à dificuldade de remediação destes ambientes, torna-se essencial o conhecimento de técnicas capazes de minimizar tal processo. Neste sentido, os sistemas alagados construídos (SACs) mostram-se como uma alternativa promissora, dada suas características peculiares, tais como custo, operação e eficiência.

Os sistemas alagados construídos, conhecidos na literatura internacional como *constructed wetlands*, são sistemas artificiais utilizados no tratamento de águas residuárias e que consistem em lagoas ou canais, nos quais são cultivadas macrófitas (plantas adaptadas a ambientes alagados). Neste tipo de sistema, atuam processos físicos, químicos e biológicos, com o objetivo principal de melhoria da qualidade da água. Os SACs são compostos por quatro compartimentos principais: plantas, meio suporte (solo ou outros materiais), biomassa microbiana (biofilme) e uma

fase aquosa carregada com contaminantes. Assim, a depuração da água se dará por meio do sistema solo-planta-micro-organismos e radiação solar funcionando como reatores (Brasil et al., 2007). Em geral, os mecanismos envolvidos, são: filtração no meio suporte e no biofilme, degradação microbiana da matéria orgânica, absorção de nutrientes pelas plantas, adsorção no meio suporte e fotodecomposição (Matos et al., 2009; Dordio, et al., 2007).

Este tipo de tratamento apresenta como vantagens o relativo baixo custo de instalação e operação, pouca necessidade de mecanização do processo, baixa exigência de manutenção e fácil operação. Assim, este sistema oferece uma relação custo/benefício atraente, apresentando-se como boa alternativa às tecnologias convencionais para a eliminação de diversas contaminantes de interesse agroindustrial. Em adição, tem-se o fato que o Brasil é um país que oferece condições climáticas e ambientais satisfatórias para implantação dos SACs, pois possui clima tropical e áreas disponíveis (Brasil et al., 2007).

Em diversos experimentos com alagados construídos têm-se mostrado a capacidade desses sistemas de remover, além de carga orgânica e nutrientes, contaminantes recalcitrantes, como os pesticidas, propiciando, muitas vezes, a redução destes contaminantes a níveis seguros para a biota e os seres humanos.

Diante das variáveis que influenciam a remoção de contaminantes na água, a escolha da cultura possui papel fundamental. Dentre as funções das macrófitas aquáticas estão incluídas, além da extração substâncias contidas na água a ser tratada, a transferência de oxigênio para o substrato, suporte para o crescimento de biofilme de bactérias (rizomas e raízes), melhoria na permeabilidade do substrato e na estética do ambiente (Matos et al., 2009).

A presença da cultura é de extrema relevância no uso de SACs para remoção de pesticidas, principalmente devido ao suporte para o biofilme, contribuindo para a adsorção e degradação do contaminante, uma vez que estes são os principais processos na biorremediação dos pesticidas (Agudelo et al., 2012; Gregoire et al., 2008).

Dados dispostos na literatura apontam que as culturas erva de bicho (*Polygonum* sp.), capim tifton 85 (*Cynodon* sp.) e hortelã de água (*Mentha aquatica* sp.), proporcionaram satisfatória eficiência no tratamento de águas residuárias em sistemas alagados construídos (Matos et al., 2009, Ramos, 2011; Avelar, 2012; Ferres, 2012). Estas culturas apresentaram bom enraizamento, alta produtividade, grande capacidade de remoção de nutrientes e contribuíram expressivamente para depuração da matéria orgânica. Apesar de estudos comprovarem a eficiência destas culturas com relação a contaminantes orgânicos e nutrientes, a literatura carece de dados a respeito da avaliação comparativa de SACs, cultivados com diferentes espécies vegetais, na remoção de compostos recalcitrantes, como por exemplo, o clorpirifós.

Em se tratando da biorremediação de pesticidas em água, tão importante quanto sua quantificação e análise da eficiência do tratamento, é a avaliação da redução da toxicidade proporcionada pelo sistema. Em experimentos tem-se verificado que a relação concentração versus toxicidade de pesticidas, geralmente não é linear, devendo ser estudada caso a caso. Deste modo, ensaios ecotoxicológicos podem ser excelente ferramenta para auxiliar na tomada de decisão com relação à introdução de contaminantes em corpos hídricos, no que se refere a não causarem prejuízos à biota aquática.

## **1.2. Objetivos**

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a capacidade de remediação de água contaminada com o inseticida clorpirifós, por meio de sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial cultivados com diferentes macrófitas. Foram estabelecidos, ainda, os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a contribuição das espécies vegetais *Polygonum punctatum*, *Cynodon* spp. e *Mentha aquatica* na remoção do contaminante clorpirifós nos sistemas estudados.
- Aferir a ecotoxicidade aguda da água afluenta e efluente aos sistemas por meio de ensaios utilizando como organismo-teste a *Daphnia similis*.
- Avaliar o efeito da recirculação do efluente, ou seja, do tempo de retenção hidráulica nos sistemas e estimar o tempo ideal para o tratamento da água até níveis seguros com relação à remoção do pesticida em estudo.

A dissertação foi redigida na forma de capítulos. No primeiro capítulo encontra-se uma revisão bibliográfica sobre as características dos inseticidas, a dinâmica destes no meio ambiente, o potencial de contaminação dos recursos hídricos com os pesticidas bem como o uso de sistemas alagados construídos para remediação de águas contendo pesticidas. O segundo capítulo é constituído de um artigo técnico-científico com a metodologia utilizada no experimento, resultados e discussão, conclusão e sugestões para trabalhos futuros.

## REFERÊNCIAS

AGUDELO C, R. M.; JARAMILLO, M. L.; PEÑUELA, G. Comparison of the removal of chlorpyrifos and dissolved organic carbon in horizontal sub-surface and surface flow wetlands. *The Science of the total environment*, v. 431, p. 271–277, 2012.

AVELAR, F. F. Desempenho de sistemas alagados construídos cultivados com *Mentha aquatica* no tratamento de esgoto sanitário. UFV, Viçosa-MG, Tese de doutorado. 79p., 2012.

BRASIL, M. S.; MATOS, A. T.; SOARES, A. A. Plantio e desempenho fenológico da taboa (*Thypha sp.*) utilizada no tratamento de esgoto doméstico em sistema alagado construído. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. v.12, n. 3, p. 266-272, 2007.

DORDIO, A. V; TEIMÃO, J.; RAMALHO, I.; CARVALHO, A J. P.; CANDEIAS, A. J. E. Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *The Science of the total environment*, v. 380, n.1-3, p. 237–246, 2007.

FERRES, G. C. Variabilidade da condutividade hidráulica e de formas do nitrogênio em sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial. UFV, Viçosa-MG, Dissertação (mestrado). 76p., 2012.

GREGOIRE, C., ELSAESSER, D., HUGUENOT, D., LANGE, J., LEBEAU, T., MERLI, A., MOSE, R., ET AL..Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems. *Environmental Chemistry Letters*, v. 7, n. 3, p. 205–231, 2008.

GUILHERME, L. R. G. et. al., Contaminação de microbacia hidrográfica pelo uso de pesticidas. *Informe Agropecuário*. (III) Belo Horizonte, n.207, p. 40-50, 2000.

MATOS, A.T.; FREITAS, W.S.; LO MONACO, P.A.V. Capacidade extratora de diferentes espécies vegetais cultivadas em sistemas alagados utilizados no tratamento de águas residuárias da suinocultura. *Ambiente & Água*, v. 4, n. 2, p. 31-45, 2009.

MÍDIO, A. F.; DA SILVA, E. S. Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos. Editora Roca Ltda, São Paulo, cap. 1, introdução. p. 1-10, 1995.

PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V.; CRUZ, I. Método para determinação de resíduos de clorpirifós em alface por cromatografia líquida de alta eficiência. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 13, p. 37-44, 2003.

POISSANT, L., BEAUVAIS, C., LAFRANCE, P. DEBLOIS, C. Pesticides in fluvial wetlands catchments under intensive agricultural activities. *The Science of the total environment*, v. 404, n. 1, p. 182–195, 2008.

## **CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA**

### **1. INSETICIDAS**

O controle de pragas em culturas agrícolas é de extrema importância, principalmente dada a necessidade de fornecer alimento à população conciliado com a otimização do uso da terra. Desta forma, tornou-se imprescindível a utilização de pesticidas de diversas classes químicas, as quais podem ser citados os herbicidas, inseticidas, acaricidas e fungicidas. No meio rural em geral, os inseticidas são amplamente utilizados, perdendo apenas para os herbicidas (Mori, 2006).

Os inseticidas são definidos como toda substância ou mistura de substâncias utilizadas com a finalidade de prevenir ou minimizar o aparecimento, destruir e repelir insetos e ácaros, bem como larvas e outras formas de seu desenvolvimento (Mídio e Silva, 1995). Tais praguicidas englobam compostos bastante diferenciados quimicamente, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: organoclorados, piretróides, organofosforados e carbamatos (Silva et al., 2001).

O uso generalizado de inseticidas sintéticos pode ser constatado no século XX, em que na primeira metade predominaram os inseticidas naturais de origem orgânica ou inorgânica, tais como piretro, rotenona e a nicotina. A partir da década de 1940, houve uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, com a inclusão de produtos com atividade inseticida que se mostraram mais potentes e mais específicos, substituindo rapidamente o inseticida de origem natural (Santos et al., 2007). Dentre estes, destaca-se o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado que teve seu poder inseticida descoberto em 1939 e foi utilizado intensivamente na agricultura e na área urbana até a década de 1980. A descoberta de seu poder inseticida foi uma revolução no controle de pragas agrícolas e de vetores em saúde pública, uma vez que mesmo utilizado em doses baixas, possuía um alto poder residual e elevada eficiência (FUNASA, 2001). Porém, o uso de alguns organoclorados foi proibido no Brasil em 1985 para o uso agrícola e

em 1998 para o uso em campanhas de saúde pública, devido à alta persistência ambiental, bioacumulação e efeitos tóxicos.

Mundialmente, a Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em 2001 destacou a necessidade de controlar a contaminação global produzido por produtos químicos tóxicos ambientais. O tratado engloba as regulamentações globais sobre a produção e utilização de pesticidas persistentes, tais como DDT, hexaclorobenzeno, pesticidas drin (aldrin, dieldrin endrin) (Bakouriet al., 2009). Assim, com as proibições e limitações de uso para os organoclorados, os inseticidas organofosforados foram ganhando espaço e sendo cada vez mais utilizados, e acabaram substituindo gradualmente os organoclorados principalmente devido à sua baixa persistência ambiental.

### **1.1. Inseticidas organofosforados**

Os inseticidas organofosforados são uma classe de pesticidas largamente aplicada na agricultura para controlar um número elevado de pestes em várias culturas. Em adição, possui aplicação em indústrias e centros urbanos no controle de vetores. São ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (Santos et al. 2007).

A principal razão para amplo uso dos compostos organofosforados como inseticidas é sua forte atividade biológica vinculada com sua relativa instabilidade na biosfera, que se traduz em uma meia-vida no ambiente na ordem de dias, enquanto que os organoclorados, no geral, possuem uma persistência de anos (Santos et al., 2007). Entretanto, possuem efeito tóxico agudo para seres humanos e outros mamíferos (FUNASA, 2001).

As propriedades físico-químicas, toxicológicas e ecotoxicológicas dos inseticidas organofosforados são as principais ferramentas para antever seu comportamento ambiental e periculosidade. O Ministério da Saúde classificou toxicologicamente os inseticidas quanto aos produtos técnicos, ingredientes ativos e produtos formulados. Na Tabela 1 são apresentados os

graus de toxicidade, a classe toxicológica para as formulações líquidas e sólidas, o limite inferior e superior da dose letal oral e dérmica (DL<sub>50</sub>) para ratos e a cor da faixa que deve constar no rótulo dos inseticidas.

**Tabela 1.** Classificação toxicológica dos inseticidas de acordo com o Ministério da Saúde.

TOXICIDADE	CLASSE	FORMULAÇÃO	DL 50 ORAL (mg kg <sup>-1</sup> )	DL 50 Dérmica (mg kg <sup>-1</sup> )	COR DA FAIXA NO RÓTULO
Extremamente Tóxico	I	Líquida Sólida	< 20 < 5	< 40 < 10	Vermelha
Altamente Tóxico	II	Líquida Sólida	> 20 e < 200 > 5 e < 50	> 40 e < 400 > 10 e < 100	Amarela
Medianamente Tóxico	III	Líquida Sólida	> 200 e < 2000 > 50 e < 500	> 400 e < 4000 > 100 e < 1000	Azul
PoucoTóxico	IV	Líquida Sólida	> 2000 > 500	> 4000 > 1000	Verde

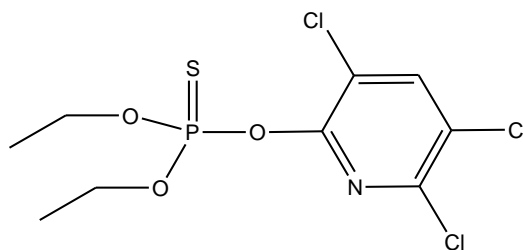
Fonte: Ministério da Saúde (1992).

É importante ressaltar que, apesar do potencial efeito nocivo à saúde humana e ao ecossistema, os inseticidas organofosforados são essenciais para a manutenção e desenvolvimento da produção agrícola brasileira. Portanto, esforços devem ser direcionados para seu uso controlado, evitando aplicações desnecessárias bem como meios de retenção destes compostos nas áreas de plantio. Deve-se também promover a conscientização dos usuários do potencial poluidor desses compostos quando atingem os recursos hídricos (Mori, 2006).

## 1.2. O clorpirifós

O Clorpirifós, cuja estrutura química está representada na Figura 1, possui nome IUPAC O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridila) fosforotioato. É um inseticida organofosforado e foi inicialmente fabricado e comercializado em 1965 pela Dow Chemical Company nos Estados Unidos. Atualmente é um

dos cinco inseticidas mais vendidos no Brasil (Guilherme et al., 2000) e apresenta mais de novecentas formulações.



**Figura 1.** Estrutura química do clorpirifós

O clorpirifós atua como inseticida e acaricida, amplamente aplicado por meio de quimigação, recomendado para o controle de diversas pragas (moscas, lagartas, ácaros, pulgões) que atacam grande número de culturas no Brasil, entre as quais estão o milho, soja, trigo, sorgo, feijão, café, algodão, citros, maçã, banana, batata, cenoura, repolho, tomate, couve e fumo. O clorpirifós age sobre os insetos e ácaros por contato, ingestão, fumigação e profundidade, ocasionando distúrbios no sistema nervoso central e provocando sua morte. Como organofosforado, pode ser absorvido pelo organismo humano via pele, trato gastrointestinal, via respiratória e membranas mucosas. Seu risco para a saúde humana está no fato de atuar como inibidor de enzimas (colinesterase), causando síndrome colinérgica, sendo, portanto, neurotóxico (Pena et al., 2003). Sua classificação no Ministério da Saúde é de altamente tóxico, Classe II (ANVISA, 2013). Assim, existe grande preocupação com relação à contaminação de corpos hídricos com este composto.

Na Tabela 2 estão apresentadas as principais propriedades físicas e químicas do clorpirifós, sendo estas essenciais para o entendimento de seu comportamento ambiental.

**Tabela 2.** Propriedades físicas e químicas do clorpirifós.

Propriedades	Características
Nome químico	O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridila) fosforotioato
Nome comum	Clorpirifós
Massa molecular	350,6 g.mol <sup>-1</sup>
Fórmula estrutura	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
Estado físico	Sólido Cristalino (CNTP)
Cor	Branca
Odor	Mercaptana
Ponto de fusão	41.5 - 42.5 °C
Ponto de ebulição	300 °C
Pressão de vapor a 25°C	2,57 x 10 <sup>-3</sup> Pa
Densidade a 21°C	1,51 g mL <sup>-1</sup>
Solubilidade	Água: 1,4 mg L <sup>-1</sup> a 25°C Diclorometano: 400 g L <sup>-1</sup> a 20 °C Metanol: 250 g dL <sup>-1</sup> a 20°C Acetato de etila: 400 g L <sup>-1</sup> a 20 °C
Coeficiente de partição n-octanol/água	50.000
Estabilidade a 25°C	pH 4,7 - 63 d pH 6,9 - 35 d pH 8,1 - 23 d
Período de carência <sup>(a)</sup>	Feijão: 25 d Demais culturas: 21 d

(a) Intervalo de tempo que deve ser observado entre a aplicação do pesticida e a colheita do produto agrícola.

Fonte: Modificado de WHO (2009).

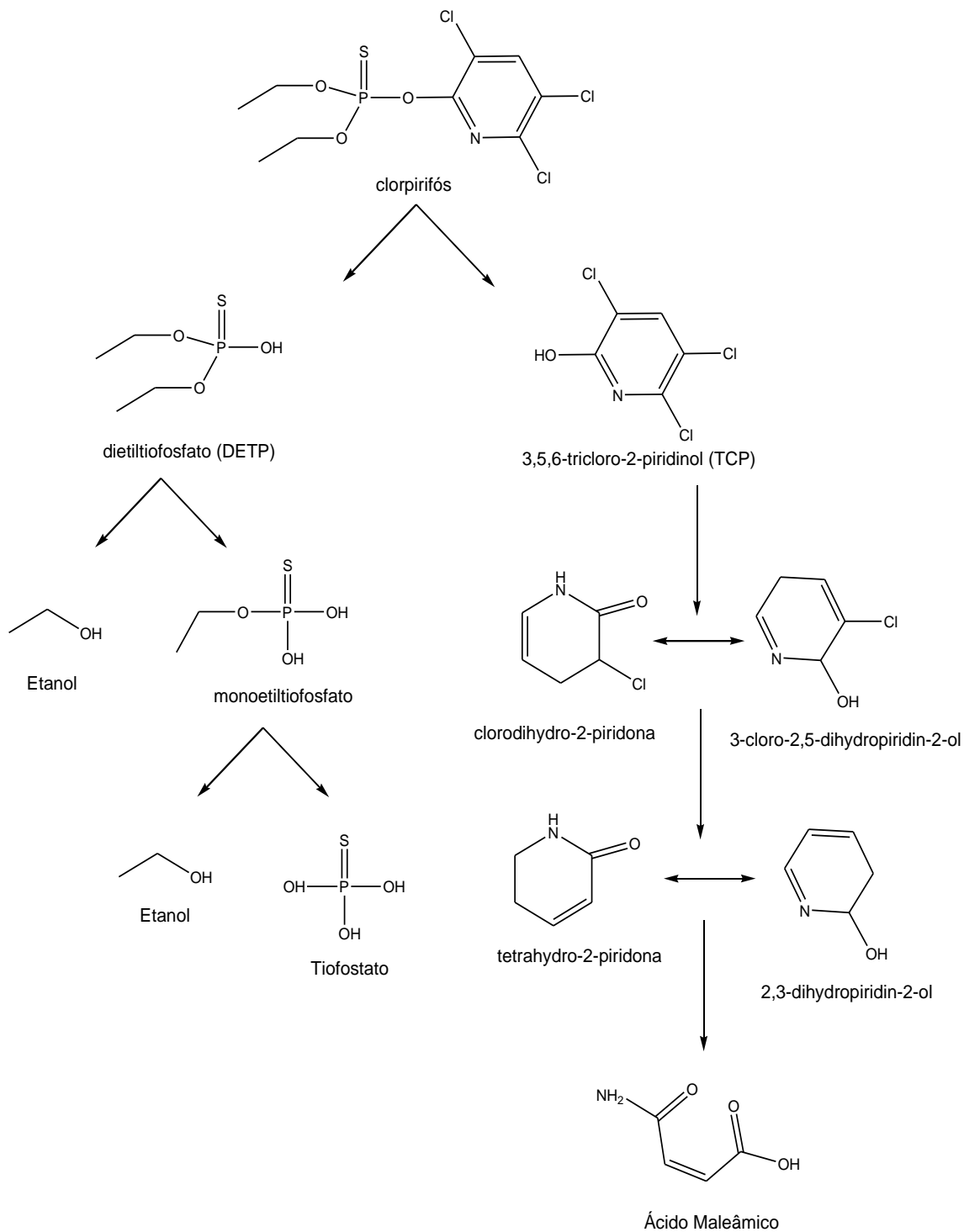
O destino ambiental do clorpirifós é afetado, além de suas propriedades físicas e químicas, pelas características do solo, práticas de aplicação e condições do meio, tais como vento, temperatura, umidade dentre outros (Halimah et al., 2010). Decorrido certo período, o clorpirifós pode sofrer modificações em sua estrutura, a qual se dá principalmente pelos mecanismos de volatilização, hidrólise, fotólise ou biodegradação.

A meia-vida de clorpirifós em solo é geralmente entre 60 e 120 dias, mas pode variar de 2 semanas a mais de 1 ano (EPA, 1999). Esta amplitude é atribuída à diversos fatores que influenciam sua degradação, tais como pH do solo, temperatura, clima, umidade, teor de carbono orgânico, formulação

de pesticidas bem como micro-organismos e flora presente. Na água, o clorpirifós é mais susceptível à degradação, possuindo meia vida de 35 a 78 dias (Racke et al., 1996).

Inicialmente, a degradação do clorpirifós foi observada em solos alcalinos e o fenômeno foi relacionado à sua hidrólise em pH elevado. No entanto, Racke et al. (1996) apontam que quando vários solos de alto pH foram esterilizados, ocorreu a inibição completa da hidrólise do clorpirifós, indicando que sua degradação possuía forte envolvimento dos micro-organismos. Mais tarde, os mesmos resultados foram confirmados por Singh et al. (2005).

A biodegradação é o fator mais determinante no destino do clorpirifós no ambiente (Anwar et al., 2009). A biotransformação deste inseticida via micro-organismos têm-se mostrado, na maioria das vezes, similar aos inseticidas organofosforados no geral. A fosfotriesterase, também chamada de organofosfatohidrolase, catalisa a degradação na primeira etapa. O mais proeminente metabólito do clorpirifós nesta fase é o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP). Outros produtos heterocíclicos têm sido identificados, incluindo o clorpirifosoxon (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosfato), desetilclorpirifos (O-etil-O-3-fosfato,5,6-tricloro-2-piridil) e TMP (3,5,6-tricloro-2 metoxipiridina) (Anwar et al., 2009). No entanto, o TCP tem sido frequentemente encontrado em concentrações comparativamente mais elevadas do que outros metabolitos (Karpuzcu et al., 2012). Está representado na Figura 2, uma rota de biotransformação do clorpirifós, em que os produtos finais possuem baixa toxicidade e podem ser utilizados como fonte de fósforo e carbono para micro-organismos.



**Figura 2.** Rota de biodegradação do clorpirifós

Fonte: Karpuzcu et al. (2013)

## **2. CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS COM PESTICIDAS**

Um pesticida dito como “ideal” apenas deveria afetar as espécies alvo e imediatamente após ser degradado em substâncias não-tóxicas. Todavia, a situação real é que após a sua aplicação, os pesticidas apresentam um comportamento ambiental complexo, consequência de vários processos físicos, químicos e biológicos que determinam o seu transporte e transformação. O conhecimento do risco de contaminação ambiental é de suma importância, principalmente com relação aos recursos hídricos. Muitas vezes é possível adotar medidas capazes de minimizar processos considerados indesejáveis.

### **2.1. Avaliação do potencial de contaminação**

O transporte de pesticidas no ambiente pode ocorrer por meio da sua movimentação vertical no solo, processo conhecido por lixiviação, da volatilização da molécula ou do escoamento superficial. Na lixiviação, os compostos caminham no perfil, acompanhando o fluxo d'água, sendo esta a principal forma de transporte no solo das moléculas não voláteis e solúveis em água (Lavorenti et al., 2003).

O destino final dos pesticidas, quando submetidos ao processo de lixiviação são águas superficiais e subterrâneas. Filizola et al. (2002) apontam que o potencial de perda pela lixiviação depende das características do pesticida, do solo, do clima e dos fatores de manejo. Pode-se citar como fatores preponderantes neste processo a solubilidade da molécula em água, a textura e a estrutura do solo e o índice pluviométrico da região em questão (Lavorenti et al., 2003).

Em se tratando de pesticidas, a mensuração de seu potencial de lixiviação pode se dar de duas formas: direta e indireta. Estimativas diretas se baseiam na aplicação do composto no campo ou em colunas de solo, e procede-se a análise em diferentes profundidades e em diferentes tempos após a aplicação. Já a análise indireta é balizada em modelos que utilizam

parâmetros para avaliação do potencial de lixiviação dos pesticidas no solo (Oliveira Jr. et al., 2001). Neste sentido, alguns modelos para avaliação do potencial de contaminação de corpos hídricos têm sido propostos. Os mais utilizados são o índice GUS, o método de GOSS e o método de *screening* sugerido pela Environmental Protection Agency (EPA).

O índice GUS (Groundwater Ubiquity Score), estabelecido por Gustafson (1989), serve como ferramenta para auxiliar para identificação de pesticidas a serem priorizados nas atividades de monitoramento ambiental, principalmente com relação à contaminação de águas subterrâneas (Ferracini et al., 2001). Este índice leva em consideração duas propriedades dos pesticidas: tempo de meia-vida do solo (DT<sub>50</sub>), ou seja, a persistência da molécula no solo, e coeficiente de adsorção à matéria orgânica (K<sub>oc</sub>), que remete a força da matriz envolvida no impedimento da lixiviação do pesticida. O índice é expresso na Equação 1. De acordo com a classificação de Gustafson (1989), moléculas com valores de GUS inferiores a 1,8 apresentam baixo potencial de lixiviação. Moléculas com valores superiores a 2,8 apresentam potencial de lixiviação elevado e moléculas com valores entre 1,8 e 2,8 devem ser analisadas caso a caso

$$GUS = \log(DT_{50}) \times (4 - \log(k_{oc})) \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que,

DT<sub>50</sub> - tempo de meia-vida no solo (dias);

K<sub>oc</sub> - coeficiente de partição entre o carbono orgânico do solo e a água (mL g<sup>-1</sup>)

Já com relação ao potencial de contaminação das águas superficiais por pesticidas, o método de Goss (Goss, 1992) é amplamente utilizado. Seus critérios estão apresentados na Tabela 3, em que três propriedades são consideradas: meia-vida no solo, coeficiente de adsorção à matéria orgânica e solubilidade em água. Neste método, os pesticidas são classificados em alto e baixo potencial de contaminação em função do transporte associado aos sedimentos ou dissolvidos em água. As

substâncias que não se enquadram em nenhum dos critérios citados são consideradas de potencial intermediário de contaminação para águas superficiais (Milhome et al., 2009).

**Tabela 3.** Método de Goss para avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais.

<b>Potencial de transporte associado ao sedimento</b>			
	<b>DT50<sub>solo</sub>(d)<sup>(a)</sup></b>	<b>K<sub>oc</sub>(mL g<sup>-1</sup>)<sup>(b)</sup></b>	<b>Solubilidade (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Alto potencial	≥40	≥1000	-
	≥40	≥500	≤0,5
Baixo potencial	<1	-	-
	≤2	≤500	-
	≤4	≤900	≥0,5
	≤40	≤500	≥0,5
	≤40	≤900	≥2
<b>Potencial de transporte dissolvido em água</b>			
Alto potencial	>35	<100000	≥1
	<35	≤700	≥10 e ≤100
Baixo potencial	-	≥100000	-
	≤1	≥1000	-
	<35	-	<0,5

(a) DT50: tempo de meia-vida; (b) K<sub>oc</sub>: coeficiente de partição à matéria orgânica.

O método de *screening* sugerido pela EPA na análise preliminar de riscos de contaminação de águas por pesticidas considera os seguintes critérios para classificar um pesticida com alto potencial de lixiviação:

- Solubilidade dos pesticidas em água maior que 30 mg L<sup>-1</sup>;
- Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo (K<sub>oc</sub>) menor que 300 – 500 mL g<sup>-1</sup>;
- Constante da Lei de Henry (K<sub>H</sub>) menor que 10<sup>-2</sup> Pa m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>;
- Especificação: negativamente carregado a pH normal do ambiente (entre 5 e 8);
- Meia-vida no solo maior que 14 a 21 dias;
- Meia-vida na água maior que 175 dias.

A constante da Lei de Henry (K<sub>H</sub>) também chamada de coeficiente de partição ambiental ar-água, juntamente com a pressão de vapor (P<sub>v</sub>),

representa a tendência do pesticida a volatilizar ou permanecer na fase aquosa.

Na Tabela 4 estão apresentadas as características de alguns pesticidas de modo a permitir a análise de potencial de contaminação de água por meio dos três métodos supracitados.

**Tabela 4.** Propriedades físicas e químicas a 20-25 °C de alguns pesticidas.

Princípio Ativo	Pressão de vapor (Pa)	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>(a)</sup>	K <sub>oc</sub> (mL g <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup>	DT <sub>50</sub> <sup>(c)</sup> no solo (dias)	DT <sub>50</sub> à hidrólise (dias)	K <sub>H</sub> <sup>(d)</sup> (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
Clorpirifós	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	1,4	4,77	4981	94	50	1,75
Monocrotofós	2,9 x 10 <sup>-4</sup>	miscível	-0,22	1	30	17	
Endosulfan	8,3 x 10 <sup>-4</sup>	0,32	4,76	12.400	50	-	2,9x 10 <sup>-2</sup>
Deltametrina	<1,33x10 <sup>-5</sup>	<0,2x10 <sup>-4</sup>	4,6	-	<23	2,5	>0,5
Λ-cialotrina	1 x 10 <sup>-6</sup>	0,005	6,8	180000	30-80	-	
Permetrina	4,5 x 10 <sup>-5</sup>	0,2	6,1	100000	30	-	
Atrasina	3,9 x 10 <sup>-5</sup>	33	2,5	124	50	105-200	2,9 x 10 <sup>-4</sup>
Simasina	2,94 x 10 <sup>-6</sup>	6,2	2,1	115	59	7	3,4 x 10 <sup>-4</sup>
Glifosato	Desprezível	900.000		24000	47	-	
Metolaclor	4,2 x 10 <sup>-3</sup>	488	2,9	175	101	>200	9 x 10 <sup>-4</sup>

(a) K<sub>ow</sub>= coeficiente de partição octanol/água; (b) K<sub>OC</sub> = coeficiente de adsorção à matéria orgânica; (c) DT<sub>50</sub> = tempo de meia-vida; (d) K<sub>H</sub> = constatne da Lei de Henry

**Fonte:** Modificado de Dores e De Lamonica Freire (2001)

## 2.2. Pesticidas em águas

Entre as possíveis rotas de contaminantes no ecossistema, os recursos hídricos têm recebido atenção especial, principalmente por agirem como integradores dos processos biogeoquímicos de qualquer região (Ribeiro et al., 2007). Tem-se o conhecimento da presença de pesticidas nas águas superficiais desde 1940, com a descoberta dos efeitos adversos resultantes da utilização de DDT e com a crescente conscientização dos problemas ambientais.

O uso de pesticidas em áreas agrícolas no combate de pragas constitui a fonte difusa destes produtos para os recursos hídricos. As fontes

pontuais de contaminação da água com pesticidas incluem despejos das indústrias fabricantes, acidentes no armazenamento e transporte e no próprio campo agrícola, como em locais de preparação das caldas, lavagem do material de aplicação e de eliminação das embalagens vazias de pesticidas, em especial na proximidade de corpos hídricos.

A legislação brasileira, por meio do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na sua Portaria nº 357 de 2005, fixaram limites máximos de alguns pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos de acordo com a classe do corpo hídrico (BRASIL, 2005). O Ministério da Saúde por meio da Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, estabelece o padrão de potabilidade, fixando valores máximos permissíveis para cada contaminante (BRASIL, 2011). No âmbito internacional, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e a Comunidade Econômica Europeia (CEE) estabeleceram seus próprios limites máximos permissíveis para concentrações ambientais e de consumo humano com relação à presença de pesticidas.

Analisando alguns estudos de contaminação de águas superficiais efetuados nos Estados Unidos, entre 1950 e 1990, Larson et al. (1997) apontaram que, dos 1180 pesticidas ou metabólitos avaliados, os quais incluem inseticidas organoclorados de uso restrito ou proibido há mais de 20 anos, 76 foram detectados em um ou mais cursos de água. Na Europa, dados publicados pela Agência Europeia do Ambiente (EEA) indicaram contaminação das águas superficiais com produtos químicos de origem agrícola, sendo frequente a menção de compostos cuja concentração ambiental é superior ao seu valor máximo admissível (EAA, 2006).

Marino e Ronco (2005) avaliaram a concentração do clorpirifós aplicado nas plantações de soja no Pampa argentino que alcançam águas superficiais. As amostras foram recolhidas em um período de dois anos, 2002 a 2004. Estes autores identificaram que a ocorrência de clorpirifós está relacionada com ocasião de chuvas após pulverização, sendo que 42% das

amostras de água e todas as amostras de sedimento apresentaram níveis detectáveis de clorpirifós.

No Brasil, estudos realizados por Laabs et al. (2002) em análise de 29 pesticidas e 3 metabólitos em amostras de água superficiais na região nordeste do Pantanal Mato-grossense, apontaram detecção de pelo menos um pesticida em 68% das amostras. Os mais encontrados foram endosulfan, ametrina, metolaclor e metribuzina. Em estudos elaborados por Filizola et al. (2002), foram analisados os pesticidas trifluralina, endosulfan, lambda cialotrina, dicofol, captan, metil paration, clorotalonil e clorpirifós em amostras de água superficial e subterrânea na região de Guaira, e constataram a presença, apenas em águas superficiais, de alguns pesticidas em concentrações variando de 0,2 a 5,66  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Marques et al. (2002) detectaram concentrações elevadas, em faixas de concentração variando de 7 a 35  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas tricolorfon e fenvalerato, ao analisarem amostras de água da barragem Boa Esperança (PI/MA). Resultados semelhantes foram encontrados por Souza et al. (2004) e Rissato et al. (2004) que, após encontrarem traços de pesticidas em águas subterrâneas e superficiais, apontam que tal fato é um indicativo da vulnerabilidade de corpos hídricos à contaminação com estes compostos.

No estado de Minas Gerais, um monitoramento mensal de águas do reservatório de Furnas, na região de Alfenas, indicou uma alta contaminação da represa com pesticidas organofosforados (Santos Neto e Siqueira, 2005). A pesquisa realizada pôde constatar que em 10% das amostras coletadas próximas as áreas de cultivo, foram encontradas 12,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 13,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 27,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  de paration metílico nos meses de análise.

A literatura é vasta no que se refere a relatos de contaminação de corpos hídricos com pesticidas. Deste modo, a remediação de ambientes bem como a mitigação do processo de contaminação torna-se imperiosa. Existem alguns métodos capazes de promover a degradação de pesticidas águas, como por exemplo, o tratamento químico, volatilização, fotodecomposição e incineração. No entanto, a maioria deles não são aplicáveis para a contaminação difusa em baixa concentração, pois são

onerosos, ineficientes e nem sempre sustentáveis (Chishti et al., 2013). Neste contexto, destacam-se a biorremediação dos pesticidas, caracterizada por processos que promovem sua biodegradação.

### **3. SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS**

Os sistemas alagados construídos (SACs), também referenciados como *constructed wetlands*, têm se destacado como tratamento biológico de águas residuárias nas últimas décadas. Estes sistemas constituem-se em lagoas ou canais, nos quais são cultivadas, em um meio suporte, plantas que toleram ambientes alagados, no geral, macrófitas aquáticas. Neste tipo de sistema, atuam processos físicos, químicos e biológicos, com o objetivo principal de melhoria da qualidade da água (Hammer et al., 1992; Matos et al., 2010a).

Os SACs são compostos por quatro compartimentos principais: plantas, meio suporte (solo, areia, brita ou outros materiais porosos), biomassa microbiana (biofilme) e uma fase aquosa carregada com contaminantes. Assim, a depuração da água se dará por meio do sistema solo-plantas-micro-organismos e radiação solar funcionando como reatores (Brasil et al., 2007). Em geral, os mecanismos envolvidos, são: filtração no meio suporte e no biofilme, degradação microbiana da matéria orgânica, absorção de nutrientes pelas plantas, adsorção no meio suporte e fotodecomposição (Matos et al., 2009; Dordio et al., 2007).

Este tipo de tratamento apresenta como vantagens o relativo baixo custo de instalação e operação, pouca necessidade de mecanização do processo, baixa exigência de manutenção e fácil operação. Assim, os SACs oferecem uma relação custo/benefício atraente, apresentando-se como boa alternativa às tecnologias convencionais para a eliminação de diversos contaminantes de interesse agroindustrial (Kadlec et al., 2000; Pardue, 2002). Em adição, tem-se o fato que o Brasil é um país que oferece condições climáticas e ambientais satisfatórias para implantação dos SACs, pois possui clima tropical e áreas disponíveis (Brasil et al., 2007).

Existem duas configurações básicas para os sistemas alagados construídos de acordo com o tipo de escoamento: superficial e subsuperficial, sendo que neste último, a água pode fluir horizontalmente ou verticalmente (Imfeld et al., 2009). Cada tipo de escoamento proporciona um grau diferente de interação do efluente com as raízes, meio suporte e biota microbiana. Segundo Avelar (2012), os SACs do tipo escoamento subsuperficial horizontal têm sido os mais estudados, em razão do menor potencial para geração de odores e um menor potencial para atração de vetores.

Diante das variáveis que influenciam a remoção de contaminantes na água em SACs, a escolha da cultura possui papel fundamental. Dentre as funções das macrófitas aquáticas estão incluídas, além da extração de nutrientes contidos na água residuária, a transferência de oxigênio para o substrato; suporte (rizomas e raízes) para o crescimento de biofilme de bactérias, melhoria na permeabilidade do substrato e na estética do ambiente (Matos et al., 2009).

### **3.1. Plantas utilizadas em SACs**

São diversas as espécies vegetais que podem ser utilizadas em sistemas alagados construídos. Todavia, algumas características devem ser consideradas na escolha da cultura, tais como: ser tolerante a condições de alagamento contínuo e altas concentrações de poluentes associados ao tipo de água que se pretende tratar; viabilidade do seu cultivo em longo prazo; aspectos estéticos do sistema; ser de rápida propagação e crescimento; fácil colheita e manejo e possuir alta capacidade de remoção de nutrientes e poluentes. Além disso, é desejado que apresentem denso sistema radicular, pouca propensão a pragas e doenças e ser passível de cortes sucessivos e frequentes (Matos et al., 2008).

Inúmeros trabalhos têm mostrado resultados positivos utilizando diversas espécies ao tratar vários tipos de água residuárias. Brasil et al.

(2007), em tratamento de esgoto doméstico efluente de tanque séptico utilizando SAC cultivado com taboa (*Typha* sp.), constataram que a mesma apresentou bom desempenho e contribuiu para a alta eficiência no tratamento, auxiliando na remoção de N, P, K, Na e matéria orgânica. Já Fia et al. (2011) avaliaram a capacidade extratora de duas espécies vegetais, taboa e capim tifton 85 (*Cynodon* sp.) para o tratamento de água residuária de suinocultura (ARS). Os autores verificaram que o capim tifton demonstrou melhor desempenho quando comparado à taboa, apresentando alta capacidade de extração de N, P, K, Cu e Zn. Matos et al., 2008, também utilizando o capim tifton 85, constataram que o mesmo se adaptou bem aos SACs, apresentando bom enraizamento, alta produtividade e grande capacidade de remover nutrientes e sódio ao tratar água residuária da indústria de laticínio(ARL).

Matos et al. (2010a) avaliaram a taboa, o capim tifton-85 e a *Alternanthera philoxeroides* no tratamento de ARS e verificaram que as plantas tiveram eficiência equivalente, com bom desempenho no tratamento. Eustáquio Jr. et al. (2010) constataram que aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) é passível de ser utilizada em SACs no tratamento de esgoto.

Avelar (2012) realizou o estudo do desempenho da espécie *Mentha aquatica* em SACs e concluiu que o cultivo da mesma proporcionou aumento na remoção de nutrientes, coliformes totais e *E. coli* no tratamento de esgoto sanitário. Ramos (2011), em avaliação das culturas erva de bicho (*Polygonum punctatum*) e capim vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) na remoção de poluentes orgânicos e nutrientes contidos em ARS observou melhor desempenho da erva de bicho, apesar de ambas apresentarem bom desempenho.

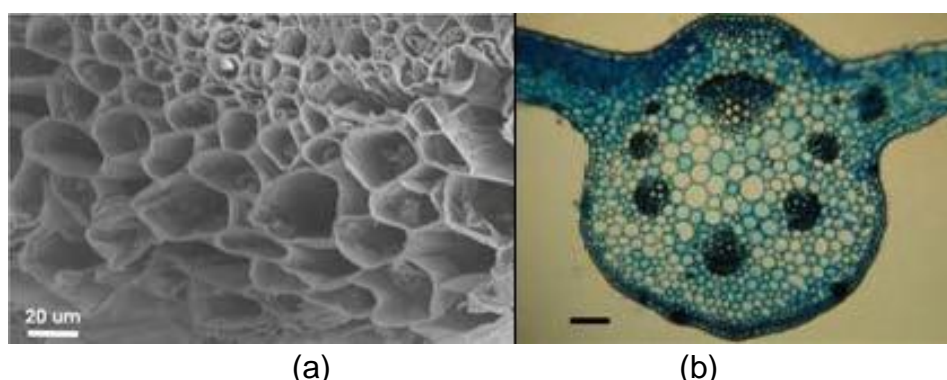
Hijosa-Valsero et al. (2011) testaram SACs cultivados com taboa e caniço (*Phragmites australis*) e verificaram que o sistema apresenta potencial de remoção de antibióticos.

Assim, é fundamental o conhecimento da espécie a ser cultivada no sistema alagado construído para otimizar o processo e propiciar alta eficiência no tratamento.

### 3.1.1. Erva de bicho

A erva de bicho é uma macrófita aquática da família Polygonaceae. Floresce em grande parte do ano, é de fácil propagação por sementes ou por pedaços da base do caule, que enraízam no nó. É considerada infestante em ambientes alagados e solos argilosos ou siltosos-orgânicos.

A erva-de-bicho está incluída dentro das espécies de plantas que respondem favoravelmente a uma baixa oxigenação do solo, formando aerênquimas. Estas estruturas são uma especialização do tecido parenquimático em que se desenvolvem grandes espaços intercelulares preenchidos por gases, geralmente interligados, formando uma fase gasosa contínua que se ramifica por todo o tecido (Figura 3) (Deuner et al., 2007). As formações destas estruturas são de grande benefício nos sistemas alagados construídos, uma vez que aumentam a capacidade da planta de captar ar atmosférico pelas folhas e transferi-lo para os rizomas e raízes, por meio dos aerênquimas. A liberação de oxigênio na zona radicular cria condições de oxidação no meio, que estimula a decomposição aeróbia ou anóxica de poluentes, o crescimento de bactérias nitrificantes e a inativação de compostos que seriam tóxicos às raízes das plantas (Matos et al., 2010b). Todavia, seu estudo em SACs ainda é incipiente.



**Figura 3.** Eletromicrografia de varredura das seções transversais da raiz (a) e lâmina foliar (b) de erva-de-bicho submetida ao alagamento

Fonte: Deuner et al. (2007)

### 3.1.2. *Mentha aquatica*

O gênero *Mentha*, pertencente à família Lamiaceae, compreende aproximadamente 30 espécies que se desenvolvem em diversas regiões da Europa, Ásia, Oceania e América do Sul (Dechamps et al., 2008). A espécie *Mentha aquatica*, conhecida como hortelã da água ou menta, é uma planta herbácea, rizomatosa, perene e de hábito de crescimento prostrado. São facilmente cultiváveis e multiplicam-se por divisão do caule, estolões, estacas ou sementes. A propagação vegetativa é o processo mais utilizado, na qual são formadas mudas com as mesmas características genotípicas da planta-mãe, ocasionando formação uniforme da cultura (Brugnera et al., 1999). As plantas apresentam crescimento rápido e fácil, podendo atingir 60 cm de altura. Possuem sistema radicular vigoroso, mas não suportam déficits hídricos prolongados (Avelar, 2012), fatores que a tornam potenciais no uso em SACs.

Os solos mais indicados para o cultivo da menta são os de alta permeabilidade, ricos em matéria orgânica, com pH próximo ao da neutralidade e com alto teor de água. Regiões de climas temperados a subtropicais são recomendáveis para o cultivo. O produto de interesse da espécie é o óleo essencial, o qual encontra aplicações em perfumaria, cosmética, higiene pessoal, bebidas, produtos alimentícios.

Em sistemas alagados construídos, alguns experimentos têm mostrado sua capacidade de reduzir poluentes, principalmente microorganismos, uma vez que produzem compostos ou antibióticos que reduzem alguns patógenos provenientes de humanos (Stottmeister et al., 2003; Avelar, 2012).

### **3.1.3. Capim tifton 85**

O capim tifton 85 (*Cynodon* sp.) é um híbrido e foi desenvolvido por Burton et al. (1993), na Coastal Plain Experiment Station (USDA-University of Georgia). O cultivar é originado do cruzamento de uma introdução sul-africana (PI 290884) com o capim tifton 68. Apresenta porte mais alto, colmos maiores, folhas mais largas, cor mais verde, rizomas desenvolvidos, elevado potencial de produção de matéria seca de alta digestibilidade (Burton et al., 1993).

O capim tifton 85 possui boas características de produção e elevada capacidade de crescimento, apresentando grande potencial de uso como forrageira nas condições subtropicais e tropicais. Seu relvado atinge até 1 m de altura e é resistente a cortes frequentes. A matéria seca produzida, em condições adequadas de manejo e adubação, é de boa qualidade, permitindo bom desempenho animal na produção de leite e carne (Matos et al., 2008).

Em SACs, alguns experimentos têm verificado que a espécie possui excelente desempenho, considerando-a apropriada para cultivo nesses sistemas de tratamento. Além do cultivo de interesse na alimentação animal, o capim tifton 85 apresentou ser eficiente na remoção de nutrientes aplicados nos SACs, alta produtividade, fechamento homogêneo, denso sistema radicular e rápida recuperação após o corte (Matos et al., 2010b; Matos et al., 2008; Fia et al., 2011; Ferres, 2012).

### **3.2. Sistemas alagados construídos na remoção de pesticidas**

Diversos experimentos com alagados construídos têm mostrado sua capacidade de remover, além de carga orgânica e nutrientes, contaminantes recalcitrantes, como os pesticidas (Moore et al., 2000; Kao et al., 2001; Braskerud; Haarstad, 2003; Sherrard et al., 2004; Borges et al., 2009; Maillard et al., 2011). Dordio et al. (2007) ainda acrescentam que conjunto

de componentes dos SACs propiciam, muitas vezes, redução destes contaminantes a níveis seguros para a biota e os seres humanos.

Elsaesser et al. (2011), estudando a biorremediação de uma mistura contendo 5 pesticidas, verificaram que os SACs não vegetados promoveram redução de 79% na toxicidade da água, enquanto que nos vegetados foram alcançadas reduções acima de 95%.

Maillard et al. (2011), em estudo de contaminantes contidos em água de escoamento superficial oriunda de área de vinhedo, mostraram que os SACs possuem plena capacidade de redução da concentração de pesticidas. Estes autores avaliaram nove fungicidas, seis herbicidas, um inseticida e quatro produtos de degradação e verificaram que a remoção variou de 39% (simazina) a 100% (cimoxanil, glufosinato, cresoxime-metilo e terbutilazina).

George et al. (2003), em avaliação de remoção de pesticidas de água de drenagem de área de acondicionamento de mudas, mostraram que os SACs vegetados com *Scirpus validus* removeram 82,4% de metolaclo-ro e 77,1% de simazina, enquanto os valores registrados nas células não vegetadas foram de 63,2% e 64,3%, respectivamente.

Na Tabela 5 estão compilados alguns dados de literatura relacionando a eficiência alcançada e condições experimentais ao se testar a remoção de pesticidas em SACs.

**Tabela 5.** Resultados experimentais obtidos em SACs na remediação de águas contendo pesticidas

Pesticida	TRH (d)	Área (m <sup>2</sup> )	Conc. Inicial	Remoção média (%)	Cultura	Referência
Ametrina	3,5	24	1 mg L <sup>-1</sup>	39	<i>Typha latifolia</i>	Borges et al. (2009)
MCPA	9	-	10 mg.L <sup>-1</sup>	60	Sem vegetação	Dordio et al. (2007)
Metacoloro	2,3 a 20	5,9 a 11,8	n.r. <sup>(1)</sup>	82 a 90%	<i>Scirpus validus</i>	Stearman et al. (2003)
Dimetoato, Dicamba, Trifloxistrobina e Tebuconazole	0,19	120	18 a 5904 ng L <sup>-1</sup>	91	<i>Phalaris arundinacea</i>	Elsaesser et al. (2011)
Dimetoato, Dicamba, Trifloxistrobina e Tebuconazole	0,23	120	18 a 5904 ng L <sup>-1</sup>	91	<i>Typha latifolia</i>	Elsaesser et al. (2011)
Dimetoato, Dicamba, Trifloxistrobina e Tebuconazole	0,09	120	18 a 5904 ng L <sup>-1</sup>	72	Sem vegetação	Elsaesser et al. (2011)
Simazina	0,28 a 0,58	54	1 a 30 µg L <sup>-1</sup>	39	<i>Phragmites australis</i> + <i>Schoenoplectus lacustris</i> + <i>Typha latifolia</i>	Maillard et al. (2011)
Cimoxanil, Glufosinato, Cresoxime-Metilo e Terbutilazina	0,28 a 0,58	54	1 a 30 µg L <sup>-1</sup>	>99	<i>Phragmites australis</i> + <i>Schoenoplectus lacustris</i> + <i>Typha latifolia</i>	Maillard et al. (2011)
Metolacoloro	2,3 a 20	5.9 a 11.8	3,9 mg L <sup>-1</sup>	62 a 96	Sem vegetação	George et al. (2003)
Clorpirifós	0 a 3	1,17	19 µg L <sup>-1</sup>	93	<i>Scirpus cyperinus</i> (L.)	Sherrard, et al. (2004)

(1) Não relatado

Apesar de constatada a eficiência de sistemas alagados construídos na remoção de contaminantes orgânicos, como os inseticidas organofosforados, pouco se sabe sobre os mecanismos de remoção de contaminantes. Estudos propostos por Imfeld et al. (2009) e Budd et al. (2011) apontam alguns dos mecanismos de remoção e destino de inseticidas em SACs. Estes autores classificam a remoção em duas formas: não destrutiva (sedimentação, adsorção no sedimento e absorção pelas plantas) e destrutiva (degradação microbiana, fitodegradação). A degradação microbiana é o mecanismo preponderante. No entanto, a forte adsorção aos sedimentos pode limitar a disponibilidade bioquímica e, assim, inibir a ação microbiana. Fatores como baixas temperaturas e conteúdo de água também podem limitar tal processo.

Budd et al. (2011) avaliaram o tempo de meia vida ( $DT_{50}$ ) de alguns pesticidas em SACs sob condições anaeróbias, o qual foi em média, inferior a um ano para  $\lambda$ -cialotrina ( $156 \pm 62$  d), cipermetrina ( $139 \pm 70$  d), esfenvalerate ( $191 \pm 87$  d) e clorpirifós ( $106 \pm 54$  d).

#### **4. ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA**

No contexto da biorremediação de pesticidas em água, tão importante quanto sua quantificação e análise da eficiência do tratamento, é a avaliação da redução da toxicidade proporcionada pelo sistema. Fernández-Alba et al. (2001) descrevem que a toxicidade de um contaminante é a resposta biológica que ele provoca. Estes autores também apontam que a relação concentração vs. toxicidade de pesticidas, geralmente, é não linear. Deste modo, os ensaios toxicológicos é uma excelente ferramenta para auxiliar na tomada de decisão com relação à introdução de contaminantes em corpos hídricos de modo a não prejudicar a biota aquática.

No âmbito da toxicologia ambiental destaca-se a ecotoxicologia, que, de acordo com o citado por Bretano (2006), é a ciência que estuda os impactos deletérios de poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas, considerando a interação dos poluentes

com o meio ambiente. Para aplicação dos princípios de ecotoxicologia, é necessário a seleção de um organismo-teste. Existem várias possibilidades para o biomonitoramento, dentre os quais pode-se citar espécies de moluscos, peixes e crustáceos e algumas espécies vegetais (Bretano, 2006). Para os recursos hídricos e efluentes de sistemas de tratamento, a utilização do microcrustáceo da espécie *Daphnia* spp (Figura 4) é amplamente citada (Knie; Lopes, 2004; Steckert, 2007).

Segundo Knie e Lopes (2004), a utilização de *Daphnia* spp. como um organismo teste baseia-se no fato de que seus descendentes são geneticamente idênticos, assegurando uniformidade de respostas nos ensaios, além de que a cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes dispêndios. O manuseio é simples, devido ao seu tamanho relativamente grande em comparação com outros microcrustáceos. A espécie reage sensivelmente aos inúmeros agentes tóxicos e seu ciclo de vida e reprodução é curto. Em adição, tem-se o fato de ser indicado pela ABNT (2009) e ser utilizado internacionalmente para análise da toxicidade aguda de efluentes líquidos, exercendo um papel importante na comunidade zooplanctônica, pois compõem um elo entre os níveis tróficos inferiores e superiores da cadeia alimentar de um ecossistema (Azevedo; Chasin, 2003).



**Figura 4.** Organismo-teste *Daphnia* sp. fêmea adulta.  
Fonte: PlosGenetics, 2011.

Neste contexto, a grande relevância da ecotoxicologia deve-se ao fato de as análises químicas fornecerem a concentração de uma dada substância na água, não permitindo informações sobre a sua biodisponibilidade nem sobre os efeitos tóxicos que essa substância as concentrações encontradas podem provocar nos seres vivos.

## REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 23p., 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Monografia de produtos agrotóxicos. [On-line]. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/i>. Acesso em: 15 janeiro de 2013

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

AVELAR, F. F. Desempenho de sistemas alagados construídos cultivados com *Mentha aquatica* no tratamento de esgoto sanitário. UFV, Viçosa-MG, Tese de doutorado. 79p., 2012.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. da. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: Rima, 340p., 2003.

BAKOURI, H. E.; USERO, J., MORILLO, J.; OUASSINI, A. Adsorptive features of acid-treated olive stones for drin pesticides: Equilibrium, kinetic and thermodynamic modeling studies. *Bioresource Technology*, 100, 4147- 4155, 2009.

BORGES, A. C; CALIJURI, M. C.; MATOS, A. T.; QUEIROZ, M. E. L. R. Horizontal subsurface flow constructed wetlands for mitigation of ametryn-contaminated water. *Water SA*, v. 35, n. 4, p. 441-446, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). PORTARIA N° 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9 de dezembro de 1991. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=560&word=> Acesso em 21 de fevereiro de 2013.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.htm](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.htm) | Acesso em: 01 de setembro de 2012.

BRASIL, M. S.; MATOS, A. T.; SOARES, A. A. Plantio e desempenho fenológico da taboa (*Typha* sp.) utilizada no tratamento de esgoto doméstico em sistema alagado construído. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 12, n. 3, p. 266-272, 2007.

BRASKERUD, B.C.; HAARSTAD, K. Screening the retention of thirteen pesticides in a small constructed wetland. Water Science and Technology, v. 48, p. 267–274, 2003.

BRENTANO, D. M. Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. Dissertação (Mestrado), UFSC, Florianópolis-SC, 146p., 2006

BRUGNERA, A.; CARDOSO, D.; BOUERI, M. A.; MALUF, W. R. Cultivo e propriedades medicinais da hortelã. 1 ed. Lavras, MG. Boletim Técnico de Hortaliças, n.34, 2p, 1999.

BUDD, R.; O'GEEN, A.; GOH, K. S.; BONDARENKO, S.; GAN, J. Removal mechanisms and fate of insecticides in constructed wetlands. Chemosphere, v. 83, n. 11, p. 1581-7, 2011.

BURTON, G.W.; GATES, R.N.; HILL, G.M. Registration of 'Tifton 85' Bermuda grass. Crop Science, v. 33, n. 3, p. 644-645, 1993.

CHISHTI, Z.; HUSSAIN, S.; ARSHAD, K. R.; KHALID, A.; ARSHAD, M. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. Journal of Environmental Management. v. 114, p. 372-380, 2013.

DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J. L.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, M. C.; ROSWALKA, L. Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de menta. Ciência e Agrotecnologia, v.32, n.3, p.725-730. 2008.

DEUNER, S.; NOGUEIRA, R. C.; ZANANDREA, I.; CASTRO, E. M.; ALVES, J. D.; MELO, E. F. Respostas Anatômicas de Plantas de Erva-de-Bicho (*Polygonum punctatum* Elliot) Submetidas ao Alagamento. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, s. 1, p. 120-122, 2007.

DORDIO, A. V.; TEIMÃO, J.; RAMALHO, I.; CARVALHO, A. J. P.; CANDEIAS, A. J. E. Selection of a support matrix for the removal of some

phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *Science of the Total Environment*, v. 380, p. 237–246, 2007.

DORES, E. F. G.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

EAA -European Environment Agency. Sustainable Use of Pesticides, 2006. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/ppps/home.htm> Acesso em: 18 jan de 2013.

ELSAESSER, D., BLANKENBERG, A. G. B; ANNA GEIST, A.; TROND MÆHLUM, T.; SCHULZ, R. Assessing the influence of vegetation on reduction of pesticide concentration in experimental surface flow constructed wetlands: Application of the toxic units approach. *Ecological Engineering*, v. 37, p.955–962, 2011.

EPA. Environmental Protection Agency. Persistent Bioaccumulative Toxic (PBT) Chemicals; Lowering of Reporting Thresholds for Certain PBT Chemicals; Addition of Certain PBT Chemicals; Community Right-to-know Toxic Chemical Reporting. US EPA, Washington (DC), 1999.

EUSTÁQUI JR., V.; MATOS, A. T.; CAMPOS, L. C.; BORGES, A. C. Desempenho agrônômico da aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) cultivada em sistemas alagados construídos. *Revista Ambiente e Água*, n. 1, v. 5, 11p., 2010.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; GUIL, L. H.; LÓPEZ, G. D.; CHISTI, Y. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica Chimica Acta*, v.426, p.289–301, 2001.

FERRACINI, V.L. et al. Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de petrolina (PE) e Juazeiro (BA). Pesticidas: *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 11, p. 1-16, 2001.

FERRES, G. C. Variabilidade da condutividade hidráulica e de formas do nitrogênio em sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial. UFV, Viçosa-MG, Dissertação de mestrado. 76p., 2012.

FIA, F. R. L.; MATOS, A. T.; FIA, R.; LAMBERT, T. F.; MATOS, M. P. Remoção de nutrientes por *Typha latifolia* e *Cynodon* spp. cultivadas em sistemas alagados construídos. *Ambi-Agua*, v. 6, n. 1, p. 77-89, 2011.

FILIZOLA, H.F. et al. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guairá. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 5, p. 659-667, 2002.

FUNASA; Fundação Nacional de Saude. Controle de Vetores Procedimentos de segurança. Ministério da Saúde. Brasília, p.157, 2001.

GEORGE, D.; STEARMAN G.K.; CARLSON, K.; LANSFORD, S. Simazine and metolachlor removal by subsurface flow constructed wetlands. *Water Environment Research*, v. 75, n. 2, p.101-112, 2003.

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

GUILHERME, L. R. G.; SILVA, M. L. N; LIMA, J. M.; RIGITANO, R. L. O. Contaminação de microbacia hidrográfica pelo uso de pesticidas. *Informe Agropecuário*. (III), n.207, p. 40-50, 2000.

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

HALIMAH, M., TAN, Y.A., ISMAIL, B.S., NASHRIYAH, M. Downward movement of chlorpyrifos in the soil of an oil palm plantation in Sepang, Selangor, Malaysia. *Journal of Oil Palm Research*, v. 22, p. 721-728, 2010.

HAMMER D.A. Designing constructed wetlands systems to treat agricultural nonpoint source pollution. *Ecological Engineering*, v. 1, p. 49–82, 1992.

HIJOSA-VALSERO, M.; FINK, G.; SCHLÜSENER, M. P.; SIDRACH-CARDONA, R.; MARTÍN-VILLACORTA, J.; TERNES, T.; BÉCARES, E. Removal of antibiotics from urban wastewater by constructed wetland optimization. *Chemosphere*, v. 83, p. 713–719, 2011.

IMFELD, G.; BRAECKEVELT, M.; KUSCHK, P.; RICHNOW, H.H. Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere*, v. 74, p. 349–362, 2009.

KADLEC R. H. , KNIGHT R.L., VYMAZAL J., BRIX H., COOPER P., HABERL R. *Constructed wetlands for pollution control*. IWA Publishing, London, p 156, 2000.

KAO, C.M.; WANG, J.Y.; WU, M.J. Evaluation of atrazine removal processes in a wetland. *Water Science Technology*, v. 44, p. 539–544, 2001.

KARPUZCU, M. E.; SEDLAK, D. L.; STRINGFELLOW, W. T. Biotransformation of chlorpyrifos in riparian wetlands in agricultural watersheds: Implications for wetland management. *Journal of hazardous materials*, v. 244-245C, p. 111-120, 2013.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289 p., 2004.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A. A.; WANTZEN, M. SILVA, C. J. ZECH, W. Pesticides in surface water, sediment and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. *Journal Environmental Quality*, v. 31 p. 1636- 1648, 2002.

LARSON, S.J., CAPEL, P.D., MAJEWSKI, M.S. Pesticides in Surface Waters: Distribution, Trends, and Governing Factors. Ann Arbor, Chelsea, M, 378p., 1997.

LAVORENTI, F.P.; REGITANO, J.B. “Comportamento de pesticidas em Solos” in Tópicos em Ciência do Solo – Vol. 3 – Fundamentos, 2003.

MAILLARD, E.; PAYRAUDEAU, S.; FAIVRE, E.; GRÉGOIRE, C.; GANGLOFF, S.; IMFELD, G. Removal of pesticide mixtures in a stormwater wetland collecting runoff from a vineyard catchment. *Science of the Total Environment* , v. 409, p. 2317–2324, 2011.

MARINO, D.; RONCO, A. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the pampa ondulata, Argentina. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology*, v. 75, n. 4, p. 820-826, 2005.

MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; QUEIROZ, M. E. R.; ORLANDA, J. F. F.; SOUSA, H. S. Análise de pesticidas em amostras ambientais oriundos da barragem de Boa Esperança (PI/MA BRASIL): Avaliação preliminar. Pesticidas. *Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 12, p. 13-30, 2002.

MARTÍN-VILLACORTA, J., THOMAS TERNES, T.; BÉCARES, E. Removal of antibiotics from urban wastewater by constructed wetland optimization. *Chemosphere* , v. 83 , p. 713–719, 2011.

MATOS, A. T.; ABRAHÃO, S. S.; PEREIRA, O. G. Desempenho agronômico de capim tifton 85 (*Cynodon spp.*) cultivado em sistemas alagados construídos utilizados no tratamento de água residuária de laticínios. *Revista Ambiente e Água*, v. 3, n. 1, p. 43-53, 2008.

MATOS, A. T.; FREITAS, W. S.; LO MONACO, P. A. V. Capacidade extratora de diferentes espécies vegetais cultivadas em sistemas alagados utilizados no tratamento de águas residuárias da suinocultura. *Revista Ambiente e Água*, v. 4, n. 2, p. 31-45, 2009.

MATOS, A.T.; FREITAS, W.S.; LO MONACO, P.A.V. Eficiência de sistemas alagados construídos na remoção de poluentes de águas residuárias da suinocultura. *Ambi-Agua*, v. 5, p. 119-132, 2010a.

MATOS, A. T.; FREITAS, W. S.; BRASIL, M. S.; BORGES, A. C. Influência da espécie vegetal cultivada nas condições redox de sistemas alagados construídos. *Engenharia Agrícola*, v.30, n.3, p.518-526, 2010b.

MÍDIO, A. F.; DA SILVA, E. S. Insecticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos. Editora Roca Ltda, São Paulo, 1995. cap. 1, introdução. p. 1-10

MILHOME, M. A. L.; SOUZA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 14, n. 3, p. 363-372, 2009.

MOORE, M. T.; RODGERS, J.H.; COOPER, C.M.; SMITH, S. Constructed wetlands for mitigation of atrazine-associated agricultural runoff. *Environmental Pollution*, v. 110, n. 3, p.393-399, 2000.

MOORE, M. T.; SCHULZ, R.; COOPER, C. M.; SMITH JR., S.; RODGERS JR, J. H. Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. *Chemosphere*, v. 46, p. 827–835, 2002.

MORI, M. N. Descontaminação de embalagens de clorpirifós utilizando o processo de oxidação avançada por radiação ionizante. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 66p., 2006.

OLIVEIRA JR, R.S.; KOSHINEN, W.C.; FERREIRA, F.A. Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. *Weed Research*, v. 41, p. 97-110, 2001.

PARDUE, J.H., Remediating chlorinated solvents in wetlands: Natural processes or an active approach In: Nehring, K.W., Brauning, S.E. (Eds.), *Wetlands and Remediation II. Proceedings of the Second International Conference on Wetlands & Remediation*, Burlington(VT), Batelle Press, Columbus(OH), USA, p. 1–8, 2000.

PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V.; CRUZ, I. Método para determinação de resíduos de clorpirifós em alface por cromatografia líquido de alta eficiência. *Pesticidas. Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 37-44, 2003.

RACKE, K. D.; STEELE, K. P.; YODER, R. N.; DICK, W. A.; AVIDOV, E. Factors affecting the hydrolitic degradation of chlorpyrifos in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 6, p. 1582-1592, 1996.

RAMOS, N. F. S. Tratamento de águas residuárias de suinocultura em sistemas alagados construídos: desempenho e modelagem hidráulica-cinética. Viçosa: DEA/UFV, Dissertação de mestrado, 96p, 2011.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 688-694, 2007.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GISELDA PASSOS GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). Química Nova, v. 27, n. 5, p. 739-743, 2004.

SANTOS NETO, A. J.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). Química Nova, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. Química Nova, v. 1, n. 30, p.159-170, 2007.

SHERRARD, R. M.; BEARR, J. S.; MURRAY-GULDE, C. L.; RODGERS, J. H.; JR. SHAH, Y.T. Feasibility of constructed wetlands for removing chlorothalonil and chlorpyrifos from aqueous mixtures. Environmental Pollution, v. 127, p. 385–394, 2004.

SILVA, J. J. O.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C. C.; MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos. Revista da Saúde Pública, v. 35, n. 2, p. 130- 135, 2001.

SINGH, B. K.; WALKER, A.; WRIGHT, D. J. Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: Dependence on structural similarity of compounds. Soil Biology e Biochemistry, v. 37, p. 1675-1682, 2005.

SOUZA, V.; CARBO, L.; DORES, E. F. G. C.; RIBEIRO, M. L; VECCHIATO, A. B.; WEBER, O. L. S.; PINTO, A. A.; SPADOTTO, C. A.; CUNHA, M. L. F. determinação de pesticidas em água de poços tubulares em áreas de cultura de algodão na microrregião de primavera do leste, Mato Grosso. XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 15 p., 2004.

STEARMAN, G. K.; GEORGE, D. B.; CARLSON, K.; LANSFORD, S. Pesticide removal from container nursery runoff in constructed wetland cells. *Journal of Environmental Quality*, v. 32, n. 4, p.1548-1556, 2003.

STECKERT, A. V. Análise ecotoxicológica da água e verificação de dano ao DNA em peixes expostos a agrotóxicos em cultura de arroz irrigado, Araranguá (SC). UNESC, 41p., 2007.

STOTTMEISTER, U.; WIEßNER, A.; KUSCHK, P.; KAPPELMEYER, U.; KASTNER, M.; BEDERSKI, O.; MULLER, R. A.; MOORMANN, H. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 93–117, 2003.

WHO. Specifications and evaluations for public health pesticides chlorpyrifos. 47p., 2009. Disponível em: [http://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos\\_WHO\\_specs\\_eval\\_Mar\\_2009.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Mar_2009.pdf) Acesso em: 30 de maio de 2013.

## CAPÍTULO 2: ARTIGO TÉCNICO-CIENTÍFICO

### REMOÇÃO DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS CULTIVADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS

#### RESUMO

O uso de pesticidas em áreas agrícolas é indispensável para manter o elevado nível de produção bem como otimizar o uso da terra. Entretanto, estes compostos podem proporcionar efeitos adversos quando alcançam os recursos hídricos, dada sua elevada toxicidade. O estudo proposto teve como objetivo avaliar a capacidade de remediação de água contendo o inseticida clorpirifós, por meio de sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial cultivados com as espécies *Polygonum punctatum*, *Cynodon* spp. e *Mentha aquatica* operados sob diferentes tempos de retenção hidráulica: 24, 48, 96, 144 e 192 h. A eficiência do sistema foi baseada na redução da concentração inicial do clorpirifós e toxicidade da água contaminada, sendo a concentração inicial do clorpirifós de 1 mg L<sup>-1</sup> para todos os sistemas. Os resultados mostraram que os sistemas alagados construídos são uma excelente alternativa na biorremediação do inseticida clorpirifós no meio aquoso, podendo ser aplicado para o tratamento de águas de escoamento de áreas agrícolas. Observou-se média geral de eficiência na remoção do inseticida de 98,6 %, sendo que já no primeiro tempo de retenção hidráulica, 24 h, houve remoção do clorpirifós para valores inferiores ao limite de detecção para todos os SACs. Tal resultado é atribuído principalmente aos processos de adsorção e degradação microbiana. Para os ensaios padronizados qualitativos de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, para a maioria das amostras observou-se a redução de toxicidade acima de 80%. Constatou-se que os testes ecotoxicológicos com os efluentes dos sistemas alagados construídos estudados são uma boa opção como indicativo da eficiência dos tratamentos e uma promissora alternativa na complementação de análises físicas e químicas.

**Palavras chave:** alagado construído; biorremediação; pesticidas.

## ABSTRACT

The use of pesticides in agricultural areas is essential to maintain the high level of production and optimize the use of land. However, these compounds may provide adverse effects when they reach water resources due its high toxicity. The proposed study had as goal to evaluate the ability of remediation of water contaminated with the insecticide chlorpyrifos through horizontal subsurface flow constructed wetlands cultivated species *Polygonum punctatum*, *Cynodon* spp. and *Mentha aquatica* at different hydraulic retention times: 24, 48, 96, 144 and 192 h. The system efficiency was based on the reduction of the concentration and toxicity of contaminated water, with initial concentration of chlorpyrifos  $1 \text{ mg L}^{-1}$  for all systems. The results showed that the constructed wetland systems are an excellent alternative in the bioremediation of insecticide chlorpyrifos in the aqueous medium and can be applied for treating water flow from agricultural areas. It was observed overall average removal efficiencies of 98.6 % of the insecticide, and in the first hydraulic retention time, 24 h, there was removal of chlorpyrifos to below the limit of detection for all CWs. This result is mainly attributed to adsorption and microbial degradation. For standard acute toxicity tests with *Daphnia similis*, for most samples there was a reduction in toxicity above 80%. Ecotoxicological tests with effluents of constructed wetland systems studied are a good choice as an indicator of the effectiveness of treatments and a promising alternative to complement the physical and chemical analyzes.

**Keywords:** constructed wetland; bioremediation; pesticides.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas em áreas agrícolas é indispensável para manter o elevado nível de produção bem como otimizar o uso da terra. Entretanto, estes compostos podem proporcionar efeitos adversos quando alcançam os recursos hídricos, dada sua elevada toxicidade (Karpuzcu et al., 2013). O escoamento superficial (*runoff*), oriundo das lavouras, constitui-se uma importante fonte difusa de contaminação de corpos hídricos, contribuindo para o comprometimento da qualidade da água para abastecimento público, dessedentação de animais e preservação da flora e fauna aquática (Budd et al., 2011).

Os pesticidas podem ser agrupados quanto sua finalidade de uso (herbicida, inseticida, fungicida, acaricida) ou quanto a classe química (organoclorados, piretróides, organofosforados e carbamatos). Devido à alta persistência e toxicidade de inseticidas organoclorados, tem-se buscado a formulação de compostos ambientalmente menos problemáticos. A utilização de inseticidas organofosforados surge como uma alternativa, uma vez que são mais biodegradáveis e considerados biologicamente mais eficientes (Karpouzias; Singh, 2006). Atualmente, os inseticidas organofosforados estão entre os inseticidas mais utilizados no Brasil e são amplamente utilizados em todo o mundo (Jardim e Caldas, 2012).

Dentre os inseticidas organofosforados, destaca-se o Clorpirifos (O,O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato), que é globalmente produzido e largamente utilizado, tanto agricultura quanto em áreas urbanas (Moore et al., 2002). O clorpirifós é aplicado em áreas agrícolas para o controle de diversas pragas que atacam grande número de culturas no Brasil. Como organofosforado, a exposição crônica humana para este pesticida e o consumo de água contaminada pode causar em longo prazo, efeitos mutagênicos, neurológicos, neuropatias, encefalopatias e distúrbios visuais (Agudelo et al., 2010). Assim, existe grande preocupação com relação à contaminação de corpos hídricos com este composto.

Em muitas pesquisas tem se verificado o sucesso do uso de sistemas alagados construídos (SACs) como alternativa de baixo custo no tratamento de águas residuárias (Brasil et al., 2007; Matos et al. 2008; Matos et al., 2009, Fia et al., 2011), incluindo água de escoamento superficial (Moore et al., 2002; Poissant et al., 2008; Mustafa et al., 2008; Maillard et al., 2011).

Os SACs são sistemas artificiais que consistem em lagoas ou canais, nos quais são cultivadas macrófitas ou plantas com boa adaptação a ambientes alagados. São compostos por quatro componentes principais: plantas, meio suporte (solo ou outros materiais), biomassa microbiana (biofilme) e uma fase aquosa carregada com contaminantes. Assim, a depuração da água se dará por meio do sistema solo-planta-micro-organismos e radiação solar, funcionando como reatores (Brasil et al., 2007). Em geral, os mecanismos envolvidos, são: filtração no meio suporte e no biofilme, degradação microbiana da matéria orgânica, absorção de nutrientes pelas plantas, adsorção no meio suporte e fotodecomposição (Matos et al., 2009; Dordio, et al., 2007).

Este tipo de tratamento apresenta como vantagens o relativo baixo custo de instalação e operação, pouca tecnificação no processo, baixa exigência de manutenção e fácil operação. Assim, os SACs oferecem uma relação custo/benefício atraente, apresentando-se como boa alternativa às tecnologias convencionais para a eliminação de diversos contaminantes de interesse agroindustrial.

A eficiência do sistema alagado construído pode ser influenciada por diversos fatores, como temperatura, tempo de retenção hidráulica (TRH) e cultura utilizada. Esta última exerce importante papel no processo de biodegradação, sendo suas principais funções: extração de substâncias contidas na água a ser tratada; transferência de oxigênio para o substrato; suporte para o crescimento de biofilme de bactérias (rizomas e raízes); melhoria na permeabilidade do substrato e na estética do ambiente (Matos et al., 2009). Dados dispostos na literatura apontam que as plantas erva de bicho (*Polygonum* spp), capim tifton 85 (*Cynodon* spp.) e *Mentha aquatica*, proporcionaram satisfatória eficiência no tratamento de águas residuárias em

sistemas alagados construídos (Matos et al., 2009, Ramos, 2011; Avelar, 2012; Ferres 2012). Estas culturas apresentaram bom enraizamento, alta produtividade, grande capacidade de remoção de nutrientes e contribuíram expressivamente para depuração da matéria orgânica.

É consenso a elevada eficiência dos sistemas alagados construídos na remoção de carga orgânica e alguns nutrientes, tais como N, P e K (Matos et al., 2010; Saeed; Sun, 2011; Ávila et al., 2013). Em adição, experimentos com alagados construídos têm mostrado sua capacidade de remover contaminantes recalcitrantes, como os pesticidas (Moore et al., 2000; Kao et al., 2001; Braskerud; Haarstad, 2003; Sherrard et al., 2004; Borges et al., 2009; Maillard et al., 2011; Agudelo et al., 2012). Dordio et al. (2007) ainda acrescentam que o conjunto de componentes dos SACs propiciam, muitas vezes, redução destes contaminantes a níveis seguros para a biota e os seres humanos. Entretanto, ainda é incipiente estudos a respeito da avaliação comparativa de SACs, cultivados com diferentes espécies vegetais, na remoção de inseticidas organofosforados, como por exemplo, o clorpirifós.

O estudo proposto teve como objetivo principal avaliar a capacidade de remediação de água contendo o inseticida clorpirifós, por meio de sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial cultivados com as espécies *Polygonum punctatum*, *Cynodon* spp. e *Mentha aquatica* em diferentes tempos de retenção hidráulica (TRH). A eficiência do sistema foi avaliada pela redução da concentração de clorpirifós e da toxicidade da água previamente contaminada com este princípio ativo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação situada nas dependências do Laboratório de Hidráulica, pertencente ao Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais de setembro de 2012 à janeiro de 2013.

### 2.1. Configuração dos sistemas alagados construídos de escoamento subsuperficial horizontal

O experimento foi composto por quatro sistemas alagados construídos de escoamento subsuperficial horizontal construídos em escala piloto, os quais serão referenciados neste trabalho como SACs. Para a remediação da água contendo o inseticida clorpirifós, testou-se 3 unidades contendo diferentes tipos vegetação e um controle, não vegetado. Os SACs foram constituídos por recipientes do tipo “cocho”, fabricados em polietileno de alta densidade (PEAD). Cada unidade possuía dimensões internas de 0,35 m de altura, 0,5 m de largura e 2,0 m de comprimento, totalizando uma área superficial de 1,0 m<sup>2</sup> e volume total de 350 L. Os SACs foram colocados nas bancadas existentes no interior da casa de vegetação a uma altura de 0,6 m, sem declividade. Os cochos foram preenchidos com brita “número zero” (diâmetro  $D_{60} = 7,0$  mm, coeficiente  $D_{60}/D_{10} = 1,6$ , índice de vazios de  $0,484 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ ) até a altura de 0,30 m, deixando-se uma borda livre de 0,05 m. O nível de água foi mantido a 0,05 m abaixo da superfície do material suporte.

A montante de cada SAC, instalou-se um reservatório com capacidade de 60 L que continha a água afluenta. Esta água era bombeada por meio de bombas dosadoras Comcept Plus (Prominent) para o interior do sistema, sendo a vazão definida pelo tempo de retenção hidráulica (TRH). A vazão era aferida uma vez por dia, e quando necessário, realizava-se o ajuste. A saída era composta por tubos de PVC de 32 mm, encaixados a uma altura de 2,0 cm do fundo de cada SAC formando um braço móvel que

possibilitava a regulação do nível de água dentro do sistema. Imediatamente abaixo do sistema de drenagem havia recipientes de coleta da água efluente.

## 2.2. Operação do sistema

As quatro unidades experimentais que constituíam o sistema foram: SAC<sub>C</sub> sem vegetação; SAC<sub>T</sub> cultivado com capim tifton 85 (*Cynodon* sp.); SAC<sub>M</sub> cultivado com menta (*Mentha aquatica*); e SAC<sub>E</sub> cultivado com Erva de bicho (*Polygonum punctatum*). Uma vez que um componente essencial do sistema alagado construído é o biofilme formado no meio suporte e raízes, antes de ser alimentado com a água contendo o inseticida clorpirifós, realizou-se o aporte de esgoto doméstico para inserção de matéria orgânica no sistema, bem como fornecimento de nutrientes às culturas. Portanto, após a construção das unidades de tratamento e implantação das espécies vegetais, todos os sistemas receberam, por 30 dias, esgoto sanitário diluído (proporção de 25% esgoto e 75% água), visando o completo estabelecimento da vegetação e formação do biofilme no substrato, sendo, posteriormente, iniciados os tratamentos específicos.

A solução contaminada com o pesticida foi formulada adicionando-se o inseticida comercial Clorpirifós Lorsban 480 BR à água tratada, de modo a obter uma concentração final de 1,0 mg L<sup>-1</sup> do princípio ativo.

Para o tratamento da água contendo o clorpirifós, foram estabelecidos os seguintes tempos de retenção hidráulica (TRH): 24, 48, 96, 144 e 192 horas, os quais foram obtidos por meio da recirculação do efluente. Estes tempos foram adotados com base na literatura consultada, a qual indica que nos sistemas alagados construídos as condições são favoráveis a degradação, o que diminui o tempo de meia vida do clorpirifós bem seu período de carência. Ademais, a adoção de TRHs muito elevados, superiores a 7 d, iriam ser inviáveis em aplicações reais de campo.

As análises de quantificação do inseticida no efluente foram realizadas a cada recirculação, o que possibilitou obter a eficiência do sistema a cada TRH proposto. Foram realizados três ciclos de análise, cada

um configurando uma repetição do experimento. Ou seja, ao término de 192 h, todo efluente era devidamente descartado e um novo afluente formulado, com concentração inicial de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo este submetido aos mesmos processos de recirculações, proporcionando os mesmos TRHs. Entre cada ciclo, foi dado um intervalo de 10 dias, com passagem de água limpa nos SACs e aporte de esgoto sanitário na mesma proporção anterior.

## **2.3. Extração e quantificação do inseticida clorpirifós**

### **2.3.1. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura**

A separação do pesticida organofosforado clorpirifós da água foi realizada de acordo com metodologia proposta por Viera et al. (2007) denominada Extração Líquido-Líquido e Partição em Baixa Temperatura (ELL-PBT) com adaptações para a extração específica do clorpirifós otimizada por Alves (2012) no Laboratório de Química Analítica (LAQUA) do Departamento de Química da UFV, conforme descrito a seguir:

- (i) extração do clorpirifós com o uso de solvente orgânico, adicionando-se 10 mL de acetonitrila a 10 mL da água a ser analisada;
- (ii) a mistura homogênea descrita anteriormente foi agitada a 175 rpm, em mesa agitadora, durante 10 min;
- (iii) o material foi resfriado a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por, no mínimo, 2,0 h;
- (iv) Após esse período, estando a água congelada, a fase orgânica líquida sobrenadante foi recuperada e submetida à análise por cromatografia gasosa.

### 2.3.2. Quantificação por cromatografia gasosa

A análise dos extratos orgânicos, para a quantificação do clorpirifós, foi realizada em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu modelo GC-2014 com detecção por captura de elétrons Ni (CG/DCE), auto injetor AOC-20i. As corridas foram gerenciadas pelo software Shimadzu GCsolution.

A identificação do clorpirifós nos cromatogramas foi feita pela comparação do tempo de retenção do analito nos extratos das amostras com o tempo de retenção de soluções padrão de clorpirifós.

A coluna utilizada e as condições analíticas estão descritas a seguir.

- Coluna capilar ZB-5, Zebron, Phenomenex (USA) com fase estacionária composta de 5 % fenil e 95 % dimetilpolissiloxano, 30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura de filme;
- Programação de temperatura da coluna:

$$150\text{ }^{\circ}\text{C (2 min)} \xrightarrow{40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}} 290\text{ }^{\circ}\text{C (2,5 min)}$$

- Tempo total de análise: 8 minutos;
- Temperatura do injetor: 280 °C;
- Temperatura do detector (ECD): 300 °C;
- Volume injetado: 1,0 µL;
- Gás de arraste: Nitrogênio;
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL.min<sup>-1</sup>;
- Divisão de fluxo: 1:5.

A quantificação do clorpirifós no extrato foi realizada pela comparação entre as áreas do clorpirifós referentes às amostras e as áreas referentes às soluções padrão.

### 2.4. Ensaio ecotoxicológico

Para realização do teste ecotoxicológico agudo, utilizou-se a espécie *Daphnia similis*. Seguiu-se metodologia proposta pela Associação Brasileira

de Normas Técnicas – ABNT que normatizou o teste por meio da NBR 12.713 (ABNT, 2009). Foi utilizado o teste qualitativo.

Neste procedimento, as amostras coletadas do afluente e do efluente aos SACs foram testadas baseando-se na exposição de neonatos de *Daphnia similis*, de 6 a 24 horas de idade, além de frascos controle (sem adição de amostra). Para cada teste foi observada a imobilidade e a mortalidade dos indivíduos após o período de exposição de 48 h. A partir dos dados de imobilidade e mortalidade dos organismos, procedeu-se a análise estatística dos dados de acordo com o proposto pela EPA (2002), sendo a normalidade verificada pelo teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste F. Como nenhuma das amostras apresentaram normalidade e homogeneidade conjuntamente, o teste não paramétrico de Wilcoxon foi aplicado para comparação dos resultados do controle com os contendo a água contaminada por meio do software SigmaPlot 11.0. O resultado do teste qualitativo é expresso como tóxico ou não tóxico. Quando a percentagem de imobilidade na amostra foi significativamente maior que o controle (nível de significância escolhido exemplo  $p \leq 0,05$ ), caracteriza-se como “tóxico” e quando não houver diferença significativa “não tóxico”. Adicionalmente, foi determinada a redução da toxicidade proporcionada pelo tratamento, analisando a mortalidade/imobilidade dos organismos na água afluente e efluente ao tratamento, utilizando-se a Equação 1.

$$\text{Redução Toxicidade (\%)} = \left(1 - \frac{M_{\text{efluente}}}{M_{\text{afluente}}}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que

$M_{\text{efluente}}$  – mortalidade/imobilidade dos indivíduos na amostra efluente ao SAC

$M_{\text{afluente}}$  – mortalidade/imobilidade dos indivíduos na amostra afluente ao SAC

## **2.5. Análise estatística da remoção do clorpirifós**

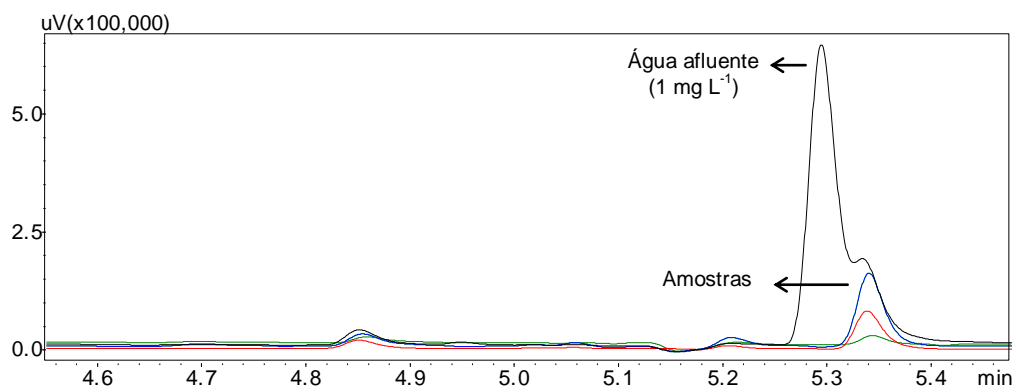
O experimento foi montado segundo um esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os tratamentos (tipo de vegetação ou ausência de vegetação) e, nas subparcelas, o tempo, no delineamento em blocos casualizados (DBC), sendo que cada ciclo representa um bloco.

Os dados de redução de concentração do contaminante dos tratamentos foram submetidos à análise de variância utilizando o software ASSISTAT 7.6 beta (2013).

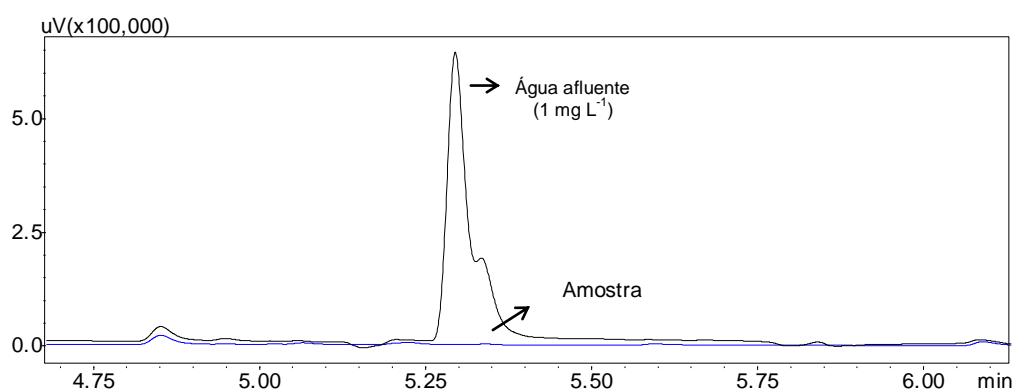
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Remoção do clorpirifós

O método de quantificação por cromatografia gasosa utilizado apresentou limite de detecção de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nas amostras em que não foi possível a identificação do pico referente ao inseticida clorpirifós, assumiu-se sua concentração igual ao limite de detecção para a análise estatística dos dados, ou seja, igual a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , assim como no trabalho de Matamoros et al. (2007). Portanto, nestes casos, a eficiência alcançada é maior que 99%, uma vez que a concentração do clorpirifós na água afluyente é de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Na Figura 1 estão dispostos alguns dos cromatogramas obtidos. Observou-se boa linearidade na curva analítica, o que confere confiabilidade na quantificação do clorpirifós nas amostras ( $r^2 = 0,99$ ). A porcentagem de recuperação obtida no procedimento de extração utilizando o princípio ativo puro foi de 93%. Na análise de uma amostra da água afluyente, obteve-se concentração de clorpirifós de  $0,94 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual se encontra próxima a formulação da calda aplicada ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e dentro do limite aceitável, uma vez que foi aplicado o clorpirifós comercial e não o de grau analítico.



(a)



(b)

**Figura 1.** Cromatogramas da análise do clorpirifós na água afluyente aos SACs e em amostras (a) acima do limite de detecção e (b) abaixo do limite de detecção.

Na Tabela 1 está apresentada a análise de variância dos dados de eficiência na remoção do inseticida clorpirifós nos sistemas alagados construídos estudados (parcela) ao longo dos tempos de retenção hidráulica (subparcelas).

**Tabela 1.** Análise de variância.

FV	GL	SQ	QM	F	
Blocos	2	15.1508	7.5754	1.4296	ns
SACs	3	15.8969	5.2990	1.0000	ns
Resíduo (a)	6	31.7938	5.2990		

Parcelas	11	62.8415			
TRH	4	17.3386	4.3346	0.9544	ns
SACs x TRH	12	55.3266	4.6106	1.0152	ns
Resíduo (b)	32	145.3303	4.5416		
Total	59	280.8370			

ns- não significativo ( $p \geq 0.05$ )

Como pode ser observado na Tabela 1, não foi necessária a aplicação do teste de comparação de médias uma vez que o F de interação não foi significativo. Ou seja, não houve diferença estatística, ao nível de 5% de significância, na remoção do clorpirifós entre os SACs estudados e ao longo dos tempos de retenção hidráulica. Na Tabela 2 apresentam-se os valores médios de eficiência de remoção do inseticida nos 4 sistemas alagados construídos ao longo dos tempos de retenção hidráulica.

**Tabela 2.** Eficiência de remoção do clorpirifós (%) nos tempos de retenção hidráulica.

SAC	TRH				
	24	48	96	144	192
SAC <sub>C</sub>	>99	>99	>99	>99	98
SAC <sub>E</sub>	>99	>99	93	>99	98
SAC <sub>M</sub>	>99	>99	>99	>99	>99
SAC <sub>T</sub>	>99	>99	>99	>99	>99

Apesar de não terem sido constatadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, nota-se alta eficiência na remoção do inseticida, com média geral de 98,6% e médias variando de 93 a maior que 99% na remoção do clorpirifós para os sistemas alagados construídos estudados. É importante salientar que tal remoção refere-se apenas ao composto clorpirifós, não sendo monitorado seus metabólitos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Agudelo et al. (2010) ao estudar a remoção do clorpirifós em sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial cultivados com caniço (*Phragmites australis*). A concentração afluente variou de 209,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a 425,6  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e coletou-se amostra 1, 7, 11 e 15 dias após aplicação. Os autores verificaram uma eficiência média de remoção 96.2% com valores variando de 92,2% a 97,4%, não sendo abordada a influência do tempo nos resultados.

Moore et al. (2002), também em avaliação da remoção do clorpirifós em SACs, obtiveram elevadas eficiências. Os autores avaliaram as concentrações afluentes de 73, 147, e 733  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós em sistemas alagados cultivados com uma combinação de culturas, sendo as principais *Juncus effusus*, *Leersia* sp. e *Ludwigia* sp. As eficiências alcançadas variaram, em média, de 84~91% em um tempo de exposição total de 84 d, sendo a maior parte da remoção observada nos primeiros 7 dias.

Sherrard et al. (2004), em alagados construídos cultivados com *Scirpus cyperinus*, estudaram a viabilidade da remoção de clorotalonil (fungicida) e clorpirifós. Avaliou-se a remoção em tempos de retenção de 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h para uma aplicação de 0,90  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós. Foi verificada uma concentração menor que 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  já na primeira amostragem, no TRH de 3 h, para o inseticida. Em uma segunda fase do experimento, foi aplicado 19.9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de clorpirifós e avaliou-se a eficiência nos tempos de 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 9; 12; 19; 24; 30; 36; 45; 48; 53; 57,5; 66 e 72 h. Foi verificado um decaimento de 93 % (1,46  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) nas primeiras 6 h de retenção, e a partir deste tempo não houve mais reduções significativas. Tais resultados vão de encontro aos resultados aqui

encontrados, uma vez que foi constatada elevada remoção do clorpirifós já no TRH de 24 horas, sendo esta superior a 99 % para todos os sistemas alagados construídos estudados, incluindo o sem vegetação. Assim, observa-se que o tempo de retenção hidráulico de 24 h é, possivelmente, superior ao necessário para remoção do inseticida clorpirifós aos níveis de 99 % nas condições estudadas.

A elevada eficiência dos quatro sistemas alagados construídos em estudo pode ser atribuída à junção de fatores construtivos, como altura da lâmina de água, fluxo, granulometria do meio suporte e às funções desempenhadas por cada constituinte do sistema (meio suporte, plantas, biofilme, radiação) (Agudelo et al., 2010) e características do inseticida estudado.

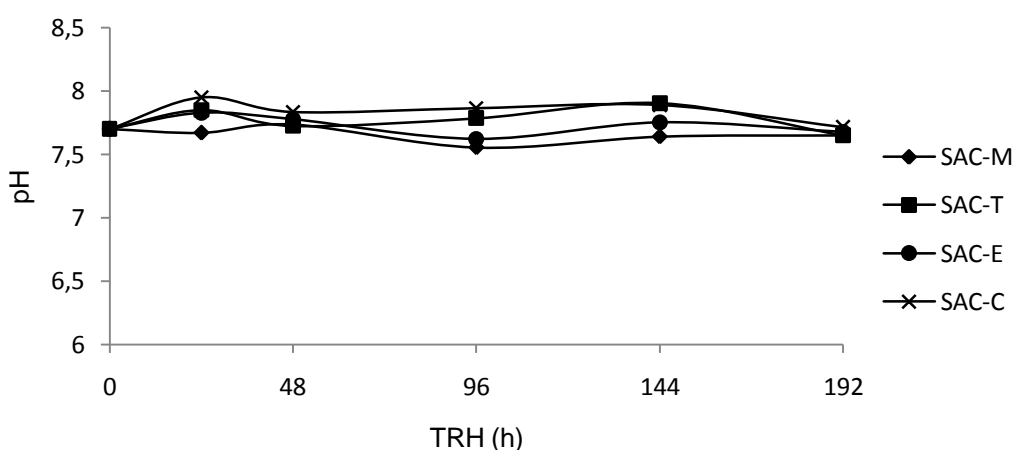
O processo inicial de remoção do clorpirifós nos SACs é sua adsorção nas raízes das plantas e meio suporte (Budd et al., 2011). Nesta etapa, o biofilme possui papel fundamental, uma vez que a superfície da matéria orgânica presente permite maior adsorção do pesticida. Entretanto, a forte adsorção pode limitar a biodisponibilidade do pesticida para a degradação, aumentando sua persistência no meio. Neste experimento, como houve aporte de esgoto sanitário antes de se iniciar os tratamentos, acredita-se que o processo de adsorção nas raízes e brita foi seguramente favorecido, implicando na remoção do clorpirifós do meio aquoso.

Juntamente com a adsorção, processos bióticos e abióticos irão atuar promovendo a degradação do pesticida. Nesta fase, a degradação microbiana atua intensamente, sendo a principal via de degradação do clorpirifós (Yang et al., 2005). Segundo Budd et al. (2011), quanto maior o conteúdo de material orgânico no sistema, maior a estabilidade microbiana. Deste modo, mais uma vez o fornecimento de esgoto doméstico no início dos três blocos do experimento foi determinante para a alta eficiência de remoção, propiciando a inserção de uma biota adequada para a biodegradação.

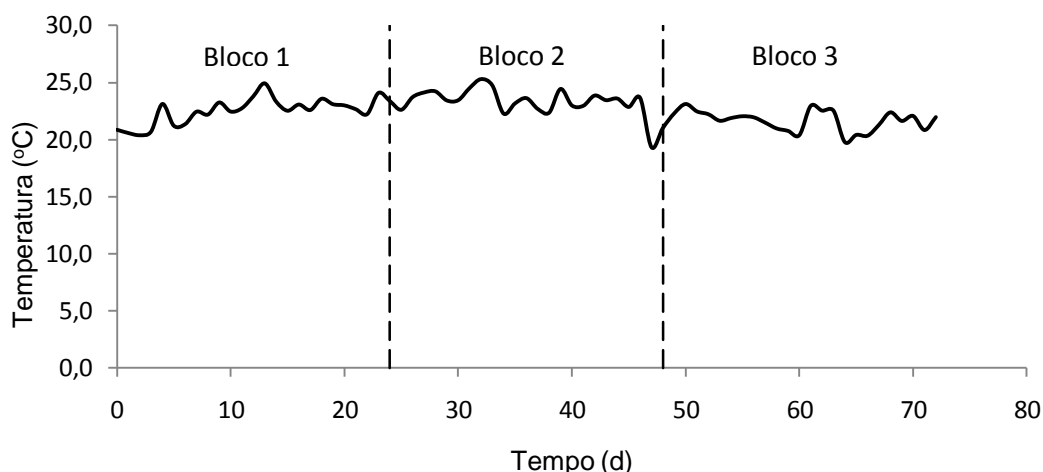
Além do conteúdo orgânico, a atividade microbiana nos sistemas alagados construídos é influenciada pelo pH, temperatura e tempo de contato com o contaminante (Budd et al., 2011).

O pH foi medido nas amostras coletadas durante a condução do experimento e os valores médio obtidos encontram-se na Figura 2, sendo o pH da água afluenta ao sistema de 7,7. Observa-se que não houve grandes variações nos valores de pH para todos os SACs ao longo dos tempos de retenção, os quais foram mantidos entre 7,6 e 8,0. Tal fato beneficia atividade microbiológica, sendo a faixa de pH ideal para as bactérias responsáveis pela degradação orgânica de 6,0 a 9,5 (Metcalf; Eddy, 2003) e também permite um possível reuso desta água para outros fins, como por exemplo, irrigação.

A temperatura externa também favoreceu o processo de degradação microbiana. Na Figura 3 estão as temperaturas médias diárias durante o experimento. Verifica-se que a temperatura externa se manteve acima de 20 °C durante quase todo o período, e portanto, não foi um fator limitante para a atividade das bactérias. Em adição, o fato de o experimento ter sido conduzido no interior de uma casa de vegetação possibilita uma temperatura interna maior com relação à externa.



**Figura 2.** Potencial hidrogeniônico médio nos SACs ao longo dos TRHs estudados.



**Figura 3.** Temperatura externa do ar ao longo do experimento

O clorpirifós e seu principal produto de degradação, o TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol) são frequentemente considerados como tóxicos a microorganismos. Todavia, experimentos com alagados construídos têm mostrado boa adaptação da comunidade microbiana a estes compostos, a qual aumenta juntamente com o aumento da concentração do pesticida (Racke et al., 2005; Anwar et al., 2009; Karpuzcu et al., 2013). Agudelo et al. (2011), em continuidade aos estudos de Agudelo et al. (2010) na remoção do clorpirifós, utilizaram os mesmos SACs para avaliar as populações bacterianas presente. Constatou-se que os microorganismos continuam a crescer após a aplicação do inseticida e possivelmente o utiliza como fonte de carbono juntamente com o TCP, o que acelera a remoção de ambos. Os principais grupos encontrados foram: heterotróficas, esporulados facultativos, nitrificantes, coliformes totais e pseudomonas (Agudelo et al., 2011). Deste modo, observa-se que a biodegradação pode ocorrer por processos aeróbios, facultativos ou anaeróbios, sendo, portanto, passível de acontecer em todas as zonas do sistema alagado construído.

Entretanto, em estudo desenvolvido por Karpuzcu et al. (2013), concluiu-se que a biodegradação do clorpirifós é significante menor em condições de baixo potencial redox, ou seja, anaeróbias. Portanto, plantas

que possuem aerênquimas, como a erva de bicho, podem beneficiar a degradação biológica, uma vez que transferem oxigênio para zona radicular.

Outro fator que contribuiu para elevada remoção do clorpirifós foi o regime hidráulico adotado. A passagem contínua da água contaminada no sistema propiciou um elevado contato do clorpirifós com o biofilme formado nas raízes e meio suporte no percurso desde a entrada até a saída dos SACs, uma vez que eram aplicadas baixas vazões, na ordem de  $2,5 \text{ L h}^{-1}$  para o TRH de 24 h.

Deste modo, fica explícito que a degradação microbiana foi fortemente favorecida neste experimento, com relação ao fornecimento de matéria orgânica e biota, pH, temperatura e tempo de retenção. Portanto, a biodegradação e a adsorção, foram, provavelmente, os processos que mais contribuíram para a eficiência maior que 99 %, já no primeiro tempo de análise (24 h) para os sistemas alagados construídos cultivados com o capim tifton 85, erva de bicho, menta e sem vegetação.

Além da adsorção nas raízes e meio suporte e a biodegradação, a degradação química produzida pela hidrólise também atua para remoção do clorpirifós do meio aquoso, sendo esta favorecida em meio alcalino (Selvi et al., 2005). O principal produto deste processo é o TCP, que como já mencionado, pode ser biodegradado. Karpuzcu et al. (2013) afirmam que os mesmos micro-organismos capazes de degradar o clorpirifós, atuam na degradação do TCP.

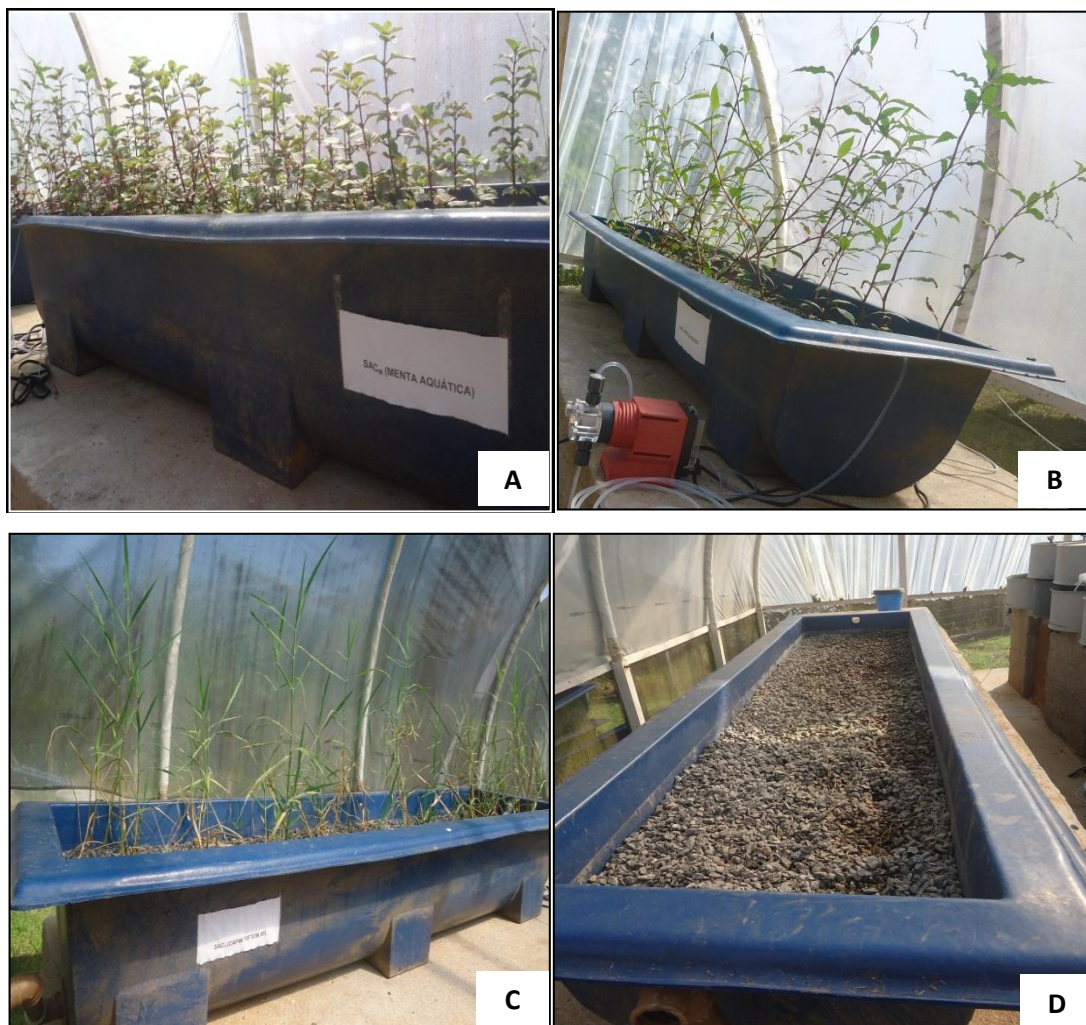
A absorção do clorpirifós pelas raízes e rizomas das plantas é uma das possíveis vias na remoção do clorpirifós da água. Todavia, quando comparada com os outros processos, como a adsorção e biodegradação, é muito inferior, sendo muitas vezes, desprezada (Gregoire et al., 2009). Rogers e Stringfellow (2009) apontam que este é um fenômeno superficial no sistema radicular, que ocorre geralmente em plantas que apresentam grande quantidade de espaço poroso interno. A erva de bicho, devido a sua capacidade de formar aerênquimas, é uma potencial planta para a absorção do clorpirifós.

O clorpirifós possui volatilidade moderada (Pressão de vapor =  $2,7 \times 10^{-3}$  Pa). De acordo com Karpuzcu et al. (2013), devido à manutenção do alagamento do sistema, a volatilização não é considerada uma via significativa de dissipação do clorpirifós em SACs. Os mesmos autores afirmam que em contrapartida, a fotólise pode contribuir expressivamente para a degradação deste inseticida quando exposto à radiação. No caso do experimento aqui conduzido, como o nível da água foi mantido 5 cm abaixo da superfície, acredita-se este processo não tenha ocorrido em larga escala.

As plantas utilizadas, capim tifton 85, erva de bicho e menta, apresentaram bom desempenho de crescimento durante o experimento, como pode ser observado na Figura 4. Entretanto, o sistema alagado construído sem vegetação (SAC<sub>c</sub>) não apresentou eficiência estatisticamente diferente quando comparado aos sistemas vegetados (Tabela 2). Tal fato indica que o tempo de retenção de 24 horas é suficiente para remoção do clorpirifós com 99 % de eficiência, independente do SAC ser vegetado ou não. Caso as análises fossem realizadas para menores TRHs, como no intervalo de horas, possivelmente as diferenças iriam ser constatadas, uma vez que diversos experimentos comprovam a influência positiva da vegetação na remoção de pesticidas (Mckinlay e Kasperek, 1999; Rogers e Stringfellow, 2009). O importante papel das plantas está relacionado, principalmente, ao fato de ser um micro-habitat exclusivo para micro-organismos benéficos e contribuírem para a formação do biofilme (Gregoire et al., 2009). Em adição, o presente estudo apenas avaliou a remoção do clorpirifós do meio aquoso. Certamente, na avaliação da degradação deste contaminante em seus metabólitos no interior dos SACs será possível destacar o diferencial das culturas, como já comprovado por diversos estudos (Stottmeister et al., 2003; Budd et al., 2011).

Apesar de ter elevada amplitude de variação de acordo com as condições ambientais, o tempo de meia vida do clorpirifós, em média, é de 50 d na água (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001). Como já citado, em menos de 24 h os sistemas alagados construídos propiciaram a remoção de 99 % do clorpirifós do meio aquoso, evidenciando o diferencial destes

sistemas e o grande benefício quando utilizado, por exemplo, para tratar água de escoamento superficial de áreas agrícolas.



**Figura 4.** Sistemas alagados construídos após o início dos tratamentos (a) SAC<sub>M</sub> cultivado com menta; (b) SAC<sub>E</sub> cultivado com erva de bicho; (c) SAC<sub>T</sub> cultivado com capim tifton 85 e (d) SAC<sub>C</sub> sem vegetação.

Analisando-se a Tabela 2, é possível observar que no SAC cultivado com erva de bicho, nos tempos de retenção de 96 e 192 h e no SAC sem vegetação, no TRH de 192 h, houve uma queda na eficiência média, passando de 99% para 93, 98 e 98 % respectivamente. Uma possível explicação é que tal fato seja devido ao processo de dessorção. As moléculas do clorpirifós que estavam adsorvidas no meio suporte, raízes e biofilme ou mesmo sedimentos, se desprenderam na passagem da água recirculada e foram carregadas, o que implicou na elevação da concentração

do clorpirifós nestas amostras. Todavia, este fenômeno não comprometeu significativamente a eficiência dos sistemas. Tal fato sugere que, a longo prazo, sistemas alagados construídos para tratamento de água contendo pesticidas podem liberar contaminantes e partículas armazenados no sistema, que são transportados via escoamento e outros processos, e têm potencial de impactar recursos hídricos a jusante (Karpuzcu et al., 2013). Portanto, é necessário o monitoramento periódico do sistema. Na literatura consultada, apesar de abordada a possibilidade, não há relatos da ocorrência deste fenômeno.

Assim, de acordo com os dados apresentados, é possível inferir que os sistemas alagados construídos estudados são capazes de remover o inseticida clorpirifós do meio aquoso, com eficiência superior a 99%, no tempo de retenção de 24 horas. Portanto, estes sistemas apresentam-se como potenciais alternativas no tratamento de águas de escoamento de áreas agrícolas contaminadas com o clorpirifós.

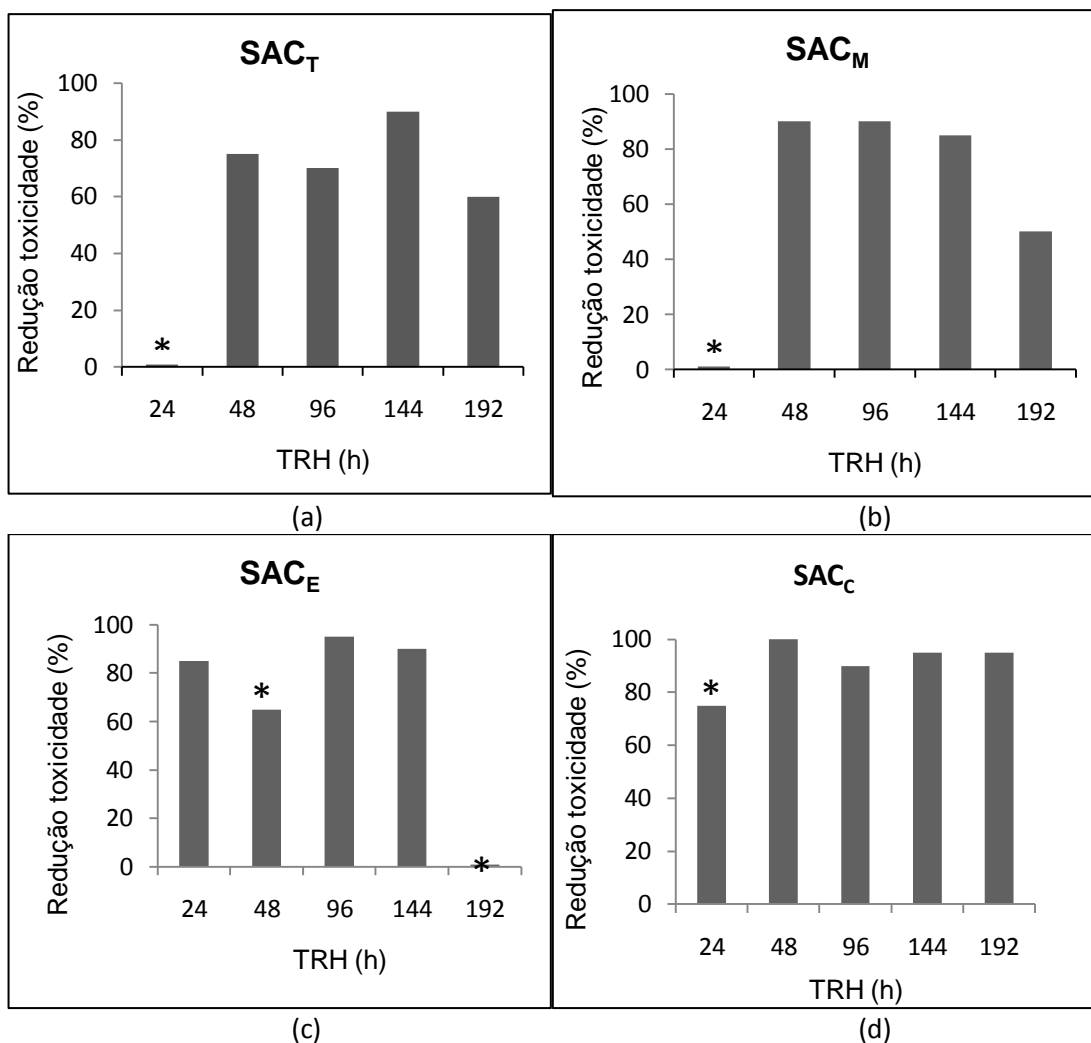
### **3.2. Ensaio de toxicidade**

Para os ensaios padronizados qualitativos de toxicidade aguda do clorpirifós na água afluyente, cuja concentração foi de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  do inseticida, observou-se alta toxicidade, havendo morte de 100% dos organismos imediatamente após exposição. Esta toxicidade é provavelmente ligada à inibição da enzima acetilcolinesterase causada pela ação do clorpirifós (Barata et al., 2004; Cáceres et al., 2007)

Para as amostras efluentes ao sistema, em consonância com os resultados de eficiência de remoção do clorpirifós apresentados anteriormente, foi evidenciada elevada redução da toxicidade para os organismos, como pode ser observado na Figura 5.

Nota-se que para os sistemas cultivados com menta, capim tifton 85 e também para o SAC não vegetado, no tempo de retenção de 24 h, as amostras permaneceram tóxicas, sendo que nos dois primeiros manteve-se com 100% de toxicidade. A concentração do clorpirifós nestas amostras

(Tabela 2) é inferior a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todavia, dada à sensibilidade destes organismos, existem diversos outros fatores que possivelmente levaram a tal resultado. Os que potencialmente podem ter atuado neste caso são: concentração de substâncias tóxicas às *Daphnias*, como nitritos, nitratos, amônia, sódio, cloro, ácidos orgânicos e até micro-organismos patogênicos (Zagatto; Bertolotti, 2006). A presença de algum destes fatores é proveniente do esgoto sanitário aplicado no início do tratamento, que pode ter levado a liberação de alguma(s) destas substâncias. A SAC cultivado com erva de bicho, apresentou toxicidade no efluente correspondente ao tempo de 48 h. No caso do esgoto sanitário ter sido o causador da toxicidade nos primeiros TRHs, o SAC<sub>E</sub> atenuou este efeito no início, que só foi verificado no TRH de 48 h. Outra possibilidade é a liberação de algum exsudado radicular, como ácidos orgânicos, neste TRH.



**Figura 5.** Resultados médios do teste de toxicidade das amostras após tratamento nos SACs, em que \* representa diferença significativa com o controle ( $p < 0,05$ ), caracterizando estas amostras como tóxicas. (a) SAC cultivado com capim tifton 85; (b) SAC cultivado com menta; (c) SAC cultivado com erva de bicho e (d) SAC sem vegetação.

Já para o SAC<sub>E</sub>, que apresentou 100% de toxicidade no tempo de retenção de 192 h, provavelmente o fator atuante foi a presença do principal composto de degradação do clorpirifós, o TCP. Em estudo realizado por Karpuzcu et al. (2013), avaliando a degradação do clorpirifós em sistemas alagados construídos, constatou-se que o TCP atinge seu pico de concentração após 7 dias da aplicação do clorpirifós, o que vai de encontro a toxicidade apresentada no TRH correspondente ao 8º dia após aplicação. Cáceres et al. (2007), em análise da toxicidade do clorpirifós e TCP para

*Daphnia carinata*, constataram que o TCP é expressivamente mais tóxico às *Daphnia* spp. que o clorpirifós, indicando que este pode ter influenciado a toxicidade no tempo de 192 h.

Pode-se observar também (Figura 5), que nos outros SACs vegetados, SAC<sub>M</sub> e SAC<sub>T</sub>, apesar de permanecerem não tóxicos pela análise estatística, verifica-se um declínio na redução da toxicidade no TRH de 192 h. Tal redução não foi verificada no SAC não vegetado, o que corrobora a hipótese de que a biodegradação nele seja menor, mesmo que remoção do clorpirifós do meio aquoso tenha sido a mesma que nos outros SACs. Esta pressuposição também sugere que a degradação do clorpirifós ocorre em velocidades diferentes nos SACs vegetados, sendo mais pronunciada no SAC cultivado com erva de bicho. O que confirma que os aerênquimas presentes na erva de bicho podem influenciar positivamente o processo de degradação do clorpirifós, transferindo oxigênio para a zona radicular.

A toxicidade do clorpirifós a várias espécies de *Daphnia* spp. foi estabelecida em diferentes estudos (Moore et al., 1998; Zalizniak; Nugegoda, 2006) e mostram uma ampla gama de variação na toxicidade, com valores de CL50<sup>1</sup> que variam de 0,06 a 169 µg L<sup>-1</sup> (Cáceres et al., 2007). Deste modo, é inviável predizer a concentração do clorpirifós nas amostras por intermédio do ensaio de toxicidade. Por outro lado, o teste se mostrou como bom indicativo da eficiência do sistema, uma vez que para maioria das amostras, a redução de toxicidade esteve acima de 80%.

A alta sensibilidade da *Daphnia similis* e o fato deste organismo ser abundante em ecossistemas aquáticos naturais fazem com que sua aplicação em testes com clorpirifós seja um excelente indicativo de contaminação de águas e eficiência de sistemas de tratamentos.

Assim, ensaios ecotoxicológicos com efluentes de sistemas alagados construídos mostram-se como alternativa promissora na complementação de análises físicas e químicas. Para a biorremediação de pesticidas em especial, estes ensaios são extremamente úteis, uma vez que seus

---

<sup>1</sup> Concentração de um composto que provoca a morte de 50% da população ensaiada

compostos de degradação podem apresentar maior toxicidade que o composto inicial, como é o caso do clorpirifós, indicando que apenas a análise quantitativa do pesticida em questão não é suficiente para concluir a respeito do impacto ambiental.

.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente estudo demonstrou-se que os sistemas alagados construídos são uma excelente alternativa na biorremediação do inseticida clorpirifós no meio aquoso, podendo ser aplicado para o tratamento de águas de escoamento de áreas agrícolas. Os resultados indicaram que:

- Não foram verificadas diferenças estatísticas na eficiência de remoção do inseticida clorpirifós para os sistemas alagados construídos estudados, sendo a média geral de remoção de 98,6 %, com valores variando de 93 a maior que 99 %;
- Sob o primeiro tempo de retenção hidráulica, 24 h, houve remoção do clorpirifós para valores inferiores ao limite de detecção ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), implicando em uma eficiência maior que 99 % para o SAC<sub>C</sub>, SAC<sub>M</sub>, SAC<sub>E</sub> e SAC<sub>T</sub>;
- Os ensaios ecotoxicológicos com os efluentes dos sistemas alagados construídos estudados, mostraram-se como alternativa promissora na complementação de análises físicas e químicas, fornecendo indicativo da eficiência dos tratamentos.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No presente estudo, constatou-se que os sistemas alagados construídos possuem alto potencial de remediação de águas contaminadas com o inseticida clorpirifós. No entanto, observou-se que vários aspectos devem ser adicionalmente estudados e têm-se expectativa que pesquisas futuras sobre o tema irão proporcionar maior entendimento do processo. Nesse sentido, sugere-se que tais temáticas:

- Avaliar a remoção do clorpirifós em SACs para tempos de retenção hidráulica menores que 24 horas;
- Analisar a persistência do clorpirifós no interior dos SACs bem como sua dinâmica de degradação, principalmente com relação ao metabólito TCP;
- Realizar comparação com um sistema alagado que não recebesse aporte orgânico, para avaliar a influencia do biofilme no processo de remoção do clorpirifós.

## REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 23p., 2009.

AGUDELO, R. M.; PEÑUELA, G.; AGUIRRE, N. J.; MORATO, J.; JARAMILLO, M. L. Simultaneous removal of chlorpyrifos and dissolved organic carbon using horizontal sub-surface flow pilot wetlands, *Ecological Engineering*, v. 36, n. 10, p. 1401-1408, 2010.

AGUDELO, R. M.; MACHADO, C.; AGUIRRE, N. J.; MORATO, J.; PENUELA, G. Optimal conditions for chlorpyrifos and dissolved organic carbon removal in subsurface flow constructed wetlands. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, v. 91, n. 7-8, p. 668-679, 2011.

AGUDELO C, R. M.; JARAMILLO, M. L.; PEÑUELA, G. Comparison of the removal of chlorpyrifos and dissolved organic carbon in horizontal sub-surface and surface flow wetlands. *The Science of the total environment*, v. 431, p. 271–277, 2012.

ALVES, R. D. Avaliação da qualidade de águas superficiais na microbacia hidrográfica do rio Manhuaçu–MG. UFV, Viçosa-MG, Exame de Qualificação, 58p., 2012.

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

AVELAR, F. F. Desempenho de sistemas alagados construídos cultivados com *Mentha aquatica* no tratamento de esgoto sanitário. UFV, Viçosa-MG, Tese de doutorado. 79p., 2012.

ÁVILA, C.; SALAS, J. J.; MARTÍN, I.; ARAGÓN, C.; GARCÍA, J. Integrated treatment of combined sewer wastewater and stormwater in a hybrid constructed wetland system in southern Spain and its further reuse, *Ecological Engineering*, v. 50, p. 13-20, 2013.

BARATA, C.; SOLAYAN, A.; PORTE, C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus ( chlorpyrifos , malathion ) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, v. 66, p. 125-139, 2004.

BORGES, A. C.; CALIJURI, M. C.; MATOS, A. T.; QUEIROZ, M. E. L. R. Horizontal subsurface flow constructed wetlands for mitigation of ametryn-contaminated water. *Water SA*, v. 35, n. 4, p. 441-446, 2009.

BRASIL, M. S.; MATOS, A. T.; SOARES, A. A. Plantio e desempenho fenológico da taboa (*Typha* sp.) utilizada no tratamento de esgoto doméstico em sistema alagado construído. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 3, p. 266-272, 2007.

BRASKERUD, B.C.; HAARSTAD, K. Screening the retention of thirteen pesticides in a small constructed wetland. *Water Science and Technology*, v. 48, p. 267–274, 2003.

BUDD, R.; O'GEEN, A.; GOH, K. S.; BONDARENKO, S.; GAN, J. Removal mechanisms and fate of insecticides in constructed wetlands. *Chemosphere*, v. 83, n. 11, p. 1581-7, 2011.

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

DORDIO, A. V.; TEIMÃO, J.; RAMALHO, I.; CARVALHO, A. J. P.; CANDEIAS, A. J. E. Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *Science of the Total Environment*, v. 380, p. 237–246, 2007.

DORES, E. F. G.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

EPA - Environmental Protection Agency. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. 350 p., 2002.

FERRES, G. C. Variabilidade da condutividade hidráulica e de formas do nitrogênio em sistemas alagados construídos de escoamento horizontal subsuperficial. UFV, Viçosa-MG, Dissertação de mestrado. 76p., 2012.

FIA, F. R. L.; MATOS, A. T.; FIA, R.; LAMBERT, T. F.; MATOS, M. P. Remoção de nutrientes por *Typha latifolia* e *Cynodon* spp. cultivadas em sistemas alagados construídos. *Ambi-Agua*, v. 6, n. 1, p. 77-89, 2011.

GREGOIRE, Ca.; ELSAESSER, D.; HUGUENOT, D. *et al.* Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems. *Environmental Chemistry Letters*, v. 7, n. 3, p. 205-231, 2008.

JARDIM, N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control*, v. 25, p. 607-616, 2012.

KAO, C.M.; WANG, J.Y.; WU, M.J. Evaluation of atrazine removal processes in a wetland. *Water Science Technology*, v. 44, p. 539–544, 2001.

KARPOUZAS, D. G.; SINGH, B. K. Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology*, v. 51, p. 119–185, 2006.

KARPUZCU, M. E.; SEDLAK, D. L.; STRINGFELLOW, W. T. Biotransformation of chlorpyrifos in riparian wetlands in agricultural watersheds: Implications for wetland management. *Journal of hazardous materials*, v. 244-245C, p. 111-120, 2013.

MAILLARD, E.; PAYRAUDEAU, S.; FAIVRE, E.; GRÉGOIRE, C.; GANGLOFF, S.; IMFELD, G. Removal of pesticide mixtures in a storm water wetland collecting runoff from a vineyard catchment. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 2317–2324, 2011.

MATAMOROS, V.; PUIGAGUT, J.; GARCÍA, J.; BAYONA, J. M. Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: a preliminary screening. *Chemosphere*, v. 69, p. 1374–1380, 2007.

MATOS, A. T.; ABRAHÃO, S. S.; PEREIRA, O. G. Desempenho agronômico de capim tifton 85 (*Cynodon spp.*) cultivado em sistemas alagados construídos utilizados no tratamento de água residuária de laticínios. *Revista Ambiente e Água*, v. 3, n. 1, p. 43-53, 2008.

MATOS, A. T.; FREITAS, W. S.; LO MONACO, P. A. V. Capacidade extratora de diferentes espécies vegetais cultivadas em sistemas alagados utilizados no tratamento de águas residuárias da suinocultura. *Revista Ambiente e Água*, v. 4, n. 2, p. 31-45, 2009.

MATOS, A.T.; FREITAS, W.S.; LO MONACO, P.A.V. Eficiência de sistemas alagados construídos na remoção de poluentes de águas residuárias da suinocultura. *Ambi-Água*, v. 5, p. 119-132, 2010.

McKINLAY, R. G.; KASPEREK, K. Observations on decontamination of herbicide-polluted water by marsh plant systems. *Water Research*, Oxford, v. 33, n. 2, p. 505-511, 1999.

METCALF E EDDY, Inc. Wastewater Engineering, Treatment and Reuse.4.ed. New York: McGraw-Hill, 1819 p., 2003.

MOORE, M.T., HUGGET, D.B., GILLESPIES,W.D., RODGERS, J.H., COOPER, C.M. Comparative toxicity of chlordane, chlorpirifos and aldicarb to four aquatic testing organisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 34, p. 152–157, 1998.

MOORE, M. T.; RODGERS, J.H.; COOPER, C.M.; SMITH, S. Constructed wetlands for mitigation of atrazine-associated agricultural runoff. Environmental Pollution, v. 110, n. 3, p.393-399, 2000.

MOORE, M. T.; SCHULZ, R.; COOPER, C. M.; SMITH JR., S.; RODGERS JR, J. H. Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. Chemosphere, v. 46, p. 827–835, 2002.

MUSTAFA, A.; SCHOLZ, M.; HARRINGTON, R.; CARROLL, P. Long-term performance of a representative integrated constructed wetland treating farmyard runoff. Ecological Engineering, v. 35, n. 5, p. 779-790, 2009

POISSANT, L., BEAUVAIS, C., LAFRANCE, P. DEBLOIS, C. Pesticides in fluvial wetlands catchments under intensive agricultural activities. The Science of the total environment, v. 404, n. 1, p. 182–95, 2008.

RACKE, K.D., LASKOWSKI, D.A., SCHULTZ, M.R. Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 38, p. 1430–1436, 2005.

RAMOS, N. F. S. Tratamento de águas residuárias de suinocultura em sistemas alagados construídos: desempenho e modelagem hidráulica-cinética. UFV, Viçosa-MG, Dissertação de mestrado, 96p., 2011.

ROGERS, M. R.; STRINGFELLOW, W. T. Partitioning of chlorpyrifos to soil and plants in vegetated agricultural drainage ditches. Chemosphere, v. 75, n. 1, p. 109-14, 2009.

SAEED, T.; SUN, G. A comparative study on the removal of nutrients and organic matter in wetland reactors employing organic media, Chemical Engineering Journal, v. 171, n. 2, p. 439-447, 2011.

SELVI, M; SARIKAYA, R.; ERKOC, F. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy *Poecilia reticulata*. Chemosphere, v. 60, p. 93-96, 2005.

SHERRARD, R. M.; BEARR, J. S.; MURRAY-GULDE, C. L.; RODGERS, J. H.; JR. SHAH, Y.T. Feasibility of constructed wetlands for removing

chlorothalonil and chlorpyrifos from aqueous mixtures. *Environmental Pollution*, v. 127, p. 385–394, 2004.

STOTTMEISTER, U.; WIEßNER, A.; KUSCHK, P.; KAPPELMEYER, U.; KASTNER, M.; BEDERSKI, O.; MULLER, R. A.; MOORMANN, H. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 93–117, 2003.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p.535-540, 2007.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 464 p., 2006.

ZALIZNIAK, L., NUGEGODA, D. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, p. 207–214, 2006.

YANG, L.; ZHAO, Y.H.; ZHANG, B. X.; YANG, C. H.; ZHANG, X. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium, *FEMS Microbiology Letters*, v. 251, p. 67–73, 2005.