# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

# **MARCELA LEMBI VITI**

Remobilização de resíduos ligados de herbicidas em solos de cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de vinhaça, palha de cana e torta de filtro e identificação dos metabólitos

Piracicaba 2014

# MARCELA LEMBI VITI

Remobilização de resíduos ligados de herbicidas em solos de cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de vinhaça, palha de cana e torta de filtro e identificação dos metabólitos

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

**Piracicaba** 

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

# Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Viti, Marcela Lembi

Remobilização de resíduos ligados de herbicidas em solos de cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de vinhaça, palha de cana e torta de filtro e identificação dos metabólitos / Marcela Lembi Viti; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - Piracicaba, 2014.

70 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1 Cobertura do solo 2.Controle químico 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Degradação do solo 5. Espectrometria de massas 6. Pesticidas 7. Proteção ambiental I. Título

CDU 661.162.2:631.453

# Dedico

Aos meus pais, Amilton José Viti e Solange Regina Lembi Viti, pelo amor incondicional e aos meus irmãos Laura Maria Lembi Viti e Pedro Henrique Lembi Viti, que são os amores da minha vida.

#### **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me guiar sempre em boas estradas, e boas companhias.

Ao professor Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, pelo carinho, enorme paciência, conversas e puxões de orelha necessários, pelos ensinamentos que vou levar comigo para a vida toda.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, por ter sido minha segunda casa nesses 6 anos (estágio, iniciação científica e mestrado), por todo o suporte e a todos os seus funcionários.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto no Brasil e na Espanha.

À Universidade de La Rioja, na Espanha, por todo o suporte e infraestrutura no desenvolvimento de parte do projeto.

À professora María Teresa Martínez Soria, por toda a paciência, amizade e aprendizado, ao Ernesto e Nines por toda a enorme ajuda com o uso do UPLC<sup>®</sup>-QTOF e aos amigos da cidade de Logroño, na Espanha.

À Dra. Ana Carolina Ribeiro Dias por toda a ajuda, inspiração e amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia, Rodrigo Pimpinato e Carlos Dorelli, por toda a ajuda dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia: Jeane, Leila, Bruno, Carol Poppi, Thaís, Sérgio, Renan, Rafael, Franz, Paulo, Nádia, Luana, Neide, Ademar e Renata pela amizade e colaboração. Em especial a Graziela e ao Cássio, por toda a ajuda na correção dessa dissertação.

Sr. Luiz Henrique Franco de Campos, pela ajuda na realização das coletas.

A Bibliotecária Chefe do CENA/USP, Marília Ribeiro Garcia Henyei.

A todos aqueles que me ajudaram, colocando a mão na massa ou apoiando de longe, meus agradecimentos.

"Porque em verdade vos digo que, se tiverdes fé como um grão de mostarda, direis a este monte: passa daqui para acolá, e há de passar; e nada vos será impossível".

Mateus 17:20

#### **RESUMO**

VITI, M. L. Remobilização de resíduos ligados de herbicidas em solos de cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de vinhaça, palha de cana e torta de filtro e identificação dos metabólitos. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A relevância ambiental da presença de resíduos ligados de herbicidas e seus metabólitos no solo são fundamentais para novas metodologias de aplicação de herbicidas, considerando a transição desses resíduos para culturas seguintes, o seu efeito sobre a biota de sistemas terrestres e aquáticos, seu potencial de transferência para a cadeia alimentar, potencial de contaminação de águas subterrâneas, e seus efeitos em longo prazo sobre a qualidade e fertilidade dos solos. A aplicação de vinhaça para fertirrigação, de palha de cana-de-açúcar e torta de filtro nos canaviais são comumente utilizadas, mas não se sabe se essas práticas provocam a remobilização e mineralização dos resíduos ligados de herbicidas no solo, podendo trazer benefícios pela degradação desses herbicidas pelos micro-organismos do solo, ou afetar a qualidade do solo, lixiviando até os lençóis freáticos. Para tal, objetivou-se com este laboratório, avaliar. em condições de а remobilização degradação/mineralização dos resíduos ligados de <sup>14</sup>C - diuron. <sup>14</sup>C - hexazinone. <sup>14</sup>C diuron + hexazinone e 14C - metribuzin em dois solos de cultivo de cana-de-açúcar, onde foram aplicadas quantidades conhecidas destes herbicidas radiomarcados com posterior tratamento de vinhaça, torta de filtro e palha de cana-de-açúcar, além de identificar os metabólitos formados a partir da remobilização. O experimento foi montado em frascos biométricos tipo Bartha coletando-se soluções de NaOH nos tempos de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias após o início do experimento e realizado a leitura no Espectrômetro de Cintilação Líquida, para determinação da mineralização dos herbicidas. Após 70 dias de incubação, os solos foram extraídos e os extratos foram lidos em Espectrômetro de Cintilação Líquida e concentrados. Realizou-se aplicação nas placas de TLC e leitura em Radio scanner. Após a extração, os solos foram oxidados em Oxidador Biológico e a radioatividade foi determinada por Espectrômetro de Cintilação Líquida. Os metabólitos dos herbicidas foram identificados através da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massa quadrupole time-of-flight. O tempo de análise foi de 9 minutos com coluna Acquity UPLC® BEH C-18 (1,7 µm, 2,1 mm d.i. x 100 mm) e temperatura de 40 °C. O metribuzin foi o menos remobilizado, com uma média de 74,98% de produto que permaneceu ligado ao solo e o hexazinone foi o mais remobilizado (evolução do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> com média de 23,78%) em ambos os solos e tratamentos. Através da avaliação das massas, fórmulas moleculares e características isotópicas, foram identificados o metabólito DCPMU (1-(3,4dichlorophenyl)-1-methylurea), originado do diuron, o metabólito B (3-cyclohexyl-6-(methylamino)-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4-(1H,3H)-dione), originado do hexazinone, e os metabólitos DA (Desamino-metribuzin), DK (Diketo-metribuzin), e DADK (Desaminodiketo-metribuzin), originados do metribuzin.

Palavras-chave: Práticas culturais. Comportamento no solo. Metabólitos.

#### **ABSTRACT**

VITI, M. L. Remobilization of bound residues of herbicides in soils cultivated with sugar cane with vinasse application, straw and filter cake and identification of metabolites. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) — Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

The environmental significance of the presence of bound residues of herbicides and their metabolites in the soil are fundamental to new methods of herbicide application, considering the transition of these residues to following crops, their effect on the biota of terrestrial and aquatic systems, the potential transfer to the food chain, the potential for contamination of groundwater, and their long term effects on the quality and fertility of soils. The application of vinasse for fertigation, straw and filter cake in sugar cane fields is often used, but it is unknown if such practice causes mineralization and remobilization of bound residues of herbicides, which may provide benefits for the degradation of the herbicides by soil microorganisms, or affect the quality of the soil, leaching to groundwater. The aim of this project is to evaluate, under laboratory conditions, the remobilization and degradation/mineralization of bound residues of <sup>14</sup>C-diuron, <sup>14</sup>C hexazinone, <sup>14</sup>C - diuron + hexazinone e <sup>14</sup>C - metribuzin in two soils for growing sugar cane, where were used known quantities of these herbicides radiolabeled with application of treatments vinasse, filter cake and straw and identify the metabolites formed from the remobilization. The experiment was performed in Bartha flasks collecting solutions of NaOH at 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 days after the beginning of the experiment and conducted the reading on the Liquid Scintillation Spectrometer to determine the mineralization of herbicides. After 70 days of incubation, the soils were extracted and the extracts were read in Liquid Scintillation Spectrometer and concentrated. Application was made on TLC plates and read on Radio scanner. After extraction, the soils were oxidized in Biological Oxidizer and the radioactivity was determined by Liquid Scintillation Spectrometer. The metabolites of the herbicides were identified by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to quadruple time-offlight mass spectrometer. The analysis time was 9 minutes with Acquity UPLC® BEH C-18 column (1.7 µm, 2.1 mm d.i. x 100 mm) and temperature of 40 °C. The metribuzin was the least remobilized, with an average of 74.98% of product that remained bound to the soil and the herbicide hexazinone was the most remobilized (14CO2 evolution averaging 23.78%) in both soils and treatments. Through the masses, molecular formulas and isotopic characteristics, were identified the metabolite DCPMU (1-(3,4dichlorophenyl)-1-methylurea), belongs to diuron, the metabolite B (3-cyclohexyl-6-(methylamino)-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4-(1H,3H)-dione), belongs to hexazinone, and the metabolites DA (Desamino-metribuzin), DK (Diketo-metribuzin), and DADK (Desamino-diketo-metribuzin), belongs to metribuzin.

Keywords: Cultural practices. Behavior in soil. Metabolites.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A cultura de cana-de-açúcar	17
2.2 Resíduos ligados e remobilização	18
2.3 Aplicação de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar	19
2.4 Aplicação de torta de filtro na cultura de cana-de-açúcar	20
2.5 Aplicação de palha na cultura de cana-de-açúcar	21
2.6 Diuron e seus metabólitos	22
2.7 Hexazinone e seus metabólitos	25
2.8 Metribuzin e seus metabólitos	28
2.9 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de mass quadrupole time-of-flight	
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Remobilização	32
3.1.1 Equipamentos e Vidrarias	32
3.1.2 Condução do experimento	32
3.1.3 Determinação da umidade nas amostras de solo (U)	35
3.1.4 Capacidade de campo nas amostras de solo (CC)	36
3.1.5 Determinação da quantidade de solo a ser pesado	37
3.1.6 Determinação do volume de água a ser adicionado aos frascos	37
3.1.7 Montagem do experimento	38
3.1.8 Extrações	41
3.2 Identificação dos metabólitos	42
3.2.1 Reagentes e padrões	42
3.2.2 Equipamentos, materiais e condições cromatográficas	42
3.2.3 Preparo das amostras para análise	44
3.2.4 Identificação dos compostos utilizando MicrOTOF-Q	44

REFERÊNCIAS	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
5 CONCLUSÕES	63
4.6 Estudo de hidrólise e oxidação	60
4.5 Identificação dos metabólitos do metribuzin	58
4.4 Identificação dos metabólitos do diuron + hexazinone	57
4.3 Identificação dos metabólitos do hexazinone	56
4.2 Identificação dos metabólitos do diuron	55
4.1 Análise estatística do estudo de remobilização	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.2.7 Estudo de oxidação	46
3.2.6 Estudo de hidrólise	45
3.2.5 Curva de calibração utilizando MicroTOF-Q	45

# 1 INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar é uma das mais importantes do Brasil, devido a enorme geração de empregos diretos, produção de açúcar, álcool combustível, subprodutos, e mais recentemente, biodiesel. O aumento da produção de álcool no Brasil gera um aumento na produção de vinhaça, onde cada litro de álcool gera aproximadamente 13 litros de vinhaça. Quando depositada no solo, a vinhaça pode promover melhoria em sua fertilidade, bem como as aplicações de palha de cana-deaçúcar e torta de filtro, porém essas aplicações têm sido contestadas pelos seus efeitos prejudiciais no solo e nas águas subterrâneas.

Nessa cultura, como em outras, o uso de agrotóxicos é amplamente utilizado, sendo a maior parte deles herbicidas para o controle de plantas daninhas. Outro fator importante no controle das plantas daninhas é a utilização de mistura de herbicidas, em aplicação conjunta (conhecida como mistura de tanque). Esta prática não é reconhecida por Lei no Brasil, mas pode gerar economia na aplicação e uma maior efetividade no controle, devido ao aumento do espectro de ação dos herbicidas.

A maneira como um herbicida se comporta no ambiente depende de suas características, e também das características do ambiente que se encontra. A degradação de herbicidas refere-se a mudanças na natureza química da molécula por processos físicos (fotodecomposição), químicos (oxidação, redução, hidrólise, formação de sais insolúveis em água e complexos químicos) ou biológicos (degradação microbiológica). A degradação, de um modo geral, é importante para reduzir o nível de resíduo dos agrotóxicos no solo (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Conforme o comportamento desse agrotóxico, ele pode ficar retido aos colóides do solo, na forma de resíduo ligado (espécies químicas que não são extraídas por métodos que não modifiquem a natureza química da matriz).

O significado ambiental da presença de resíduos ligados de herbicidas no solo é importante para novas metodologias de aplicação de herbicidas, pois deve ser levada em consideração a transição desses resíduos para culturas seguintes, o seu efeito sobre a biota de sistemas terrestres e aquáticos, seu potencial de

transferência para a cadeia alimentar, potencial de contaminação de águas subterrâneas, e seus efeitos em longo prazo sobre a qualidade e fertilidade dos solos (GEVAO et al., 2003).

O estudo do comportamento, da presença e do destino desses resíduos ligados de agrotóxicos no solo após a aplicação de vinhaça, palha de cana-de-açúcar e torta de filtro é importante para saber os efeitos dessa aplicação; podendo haver remobilização e posterior mineralização dos herbicidas, ou apenas a remobilização e por consequência a contaminação de águas subterrâneas, afetando também a qualidade do solo. A biodisponibilidade desses resíduos pode ser um fator mais importante para a saúde humana e ambiental, do que a quantidade aplicada ou até mesmo do resíduo ligado. Uma linha de pesquisa vem surgindo com a finalidade de verificar se, após a formação dos resíduos ligados, eles teriam a capacidade de se remobilizarem no ambiente (PEIXOTO et al., 2005). A identificação dos metabólitos formados também é de extrema importância, pois muitas vezes os próprios metabólitos são mais agressivos ao meio ambiente do que o produto original.

Objetivou com este trabalho avaliar, em condições de laboratório, a remobilização e degradação/mineralização dos resíduos ligados de <sup>14</sup>C - diuron, <sup>14</sup>C - hexazinone, <sup>14</sup>C - diuron + hexazinone e <sup>14</sup>C - metribuzin em dois solos contrastantes de cultivo de cana-de-açúcar, onde foram aplicadas quantidades conhecidas destes herbicidas radiomarcados com posterior tratamento de vinhaça, torta de filtro e palha de cana-de-açúcar, além de identificar os metabólitos formados a partir da remobilização.

# **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 A cultura de cana-de-açúcar

Segundo dados do Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2014/15 será de aproximadamente 9.130,1 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores. O Estado de São Paulo é o maior produtor com 51,7% da área plantada. A produção total de cana-de-açúcar moída na safra 2014/15 é estimada em 671,69 milhões de toneladas, com aumento de 2,0% em relação à safra 2013/14. A produção de açúcar para esta safra está estimada em 39,46 milhões de toneladas e a produção de etanol em 28,37 bilhões de litros (CONAB, 2014).

Um dos principais problemas enfrentados pela cultura de cana-de-açúcar, segundo Victória Filho e Christoffoleti (2004) é a interferência sofrida pela presença de plantas daninhas, que podem provocar perdas na produtividade da cultura, em até 85%, quando não controladas adequadamente. A cana-de-açúcar, apesar de representar o ciclo C4 e usar de maneira altamente eficiente os recursos disponíveis para seu desenvolvimento, é afetada nas fases iniciais de crescimento pelas plantas daninhas, principalmente por gramíneas e ciperáceas.

Pode-se dizer que a maioria dos herbicidas com recomendação de uso na cultura da cana-de-açúcar, seja por meio de aplicações em pré-plantio ou pré-emergência, ou por meio de pós-emergência inicial, atinge o solo (LAVORENTI, 2003).

Baseado nas informações disponibilizadas no site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA – AGROFIT (BRASIL, 2014), entre os herbicidas registrados para a cultura de canade-açúcar, destacam-se o diuron, diuron + hexazinone, hexazinone e metribuzin.

### 2.2 Resíduos ligados e remobilização

Segundo Lavorenti (2002), o destino dos agrotóxicos quando aplicado nas culturas pode ser a transformação de produtos de menor toxicidade, ou raramente de maior toxicidade, ou transportado para outros compartimentos do ambiente, que não o sistema solo, podendo atingir o lençol freático, ou pode acontecer de o agrotóxico ficar retido ao sistema solo na forma de resíduo ligado, e permanecer por longos períodos sem manifestar sua atividade.

A definição de resíduos ligados proposta por Roberts (1984), adotada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e geralmente aceita na literatura é "substâncias químicas originárias de agrotóxicos, utilizadas de acordo com as boas práticas agrícolas, que não são extraídas por métodos que não alterem significativamente a natureza química desses resíduos".

Quando uma molécula de agrotóxico encontra-se sorvida aos colóides, ela pode se apresentar na forma de resíduo ligado (não disponível) (LAVORENTI, 1997), porém resíduos ligados de agrotóxicos não devem ser considerados como permanentemente ligados porque haverá sempre um potencial para reversibilidade parcial da ligação. Então, o termo remobilização entra em ação, para explicar porque o que antes estava imóvel, agora tem potencial de mover-se ou organizar-se novamente (LAVORENTI, 2002).

Segundo Prata e Lavorenti (2000), quando qualquer tipo de material orgânico é adicionado a um solo em que foi aplicado um determinado herbicida, este material pode influenciar de duas maneiras no comportamento da molécula: aumentando a sorção do herbicida, indisponibilizando-o, ou ativando a microbiota do solo e, assim, promovendo um aumento da sua degradação. A atividade microbiana é reconhecida como um dos fatores mais importantes na eliminação de produtos químicos no ambiente.

Segundo Klaassen (2008), se uma substância original for mais tóxica que seus produtos de degradação, o aumento da sua biotransformação acarretará em um aumento dos produtos de degradação diminuindo a sua toxicidade. No entanto,

se a toxicidade do produto químico for, em grande parte, devido a um produto metabólico, a inibição da sua biotransformação irá diminuir a sua toxicidade.

"Deve-se destacar a importância da remobilização provocada pela biofertilização que disponibiliza fungos, bactérias e leveduras no solo tratado com palha da cana, vinhaça e torta de filtro, facilitando a biodegradação e mineralização dos agrotóxicos, trazendo um benefício complementar ao agroecossistema" (informação verbal)<sup>1</sup>.

# 2.3 Aplicação de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar

Nas usinas de cana-de-açúcar, a vinhaça resultado do processo de produção do álcool é um dos resíduos mais importantes das destilarias. Esse resíduo caracteriza-se pela elevada proporção em que é produzido (aproximadamente 13 vezes o volume de álcool ou de aguardente) (CETESB, 2006).

Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB (2006), vinhaça é líquido derivado da destilação do vinho, que é resultante da fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou melaço. A dosagem para a aplicação de vinhaça para enriquecimento do solo agrícola deverá ser calculada considerando a profundidade e a fertilidade do solo, a concentração de potássio na vinhaça e a extração média desse elemento pela cultura, conforme equação abaixo.

A dosagem máxima de vinhaça a ser aplicada no tratamento de solos agrícolas em cultura de cana-de-açúcar é determinada pela Equação 1 segundo proposto pela CETESB (2006).

$$m^3$$
 de vinhaça/ha = [(0,05 x CTC – ks) x 3744 + 185] / kvi (1)

\_

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Informação fornecida pelo Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, em 2014.

#### Onde:

0.05 = 5% da CTC;

CTC = Capacidade de Troca Catiônica, expressa em cmol<sub>c</sub>·dm<sup>-3</sup>, dada pela análise de fertilidade do solo;

ks = concentração de potássio no solo, expresso em cmol<sub>c</sub>·dm<sup>-3</sup>, à profundidade de 0 a 0,80 m;

3744 = constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em cmol<sub>c</sub>·dm<sup>-3</sup>, para kg de potássio em um volume de 1 (um) hectare por 0,80 m de profundidade;

185 = massa, em kg, de  $K_2O$  extraído pela cultura por hectare, por corte; kvi = concentração de potássio na vinhaça, expressa em kg de  $K_2O \cdot m^{-3}$ .

Na usina de estudo, localizada no Estado de São Paulo, a concentração de potássio na vinhaça (kvi) é analisada três vezes ao dia, e de acordo com esses dados, e com as características do solo, a aplicação da vinhaça no campo é realizada em média de 300 m<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup> (informação verbal)<sup>2</sup>.

# 2.4 Aplicação de torta de filtro na cultura de cana-de-açúcar

A torta de filtro é um resíduo composto da mistura de bagaço moído e lodo da decantação, sendo proveniente do processo de clarificação do açúcar. Para cada tonelada de cana moída são produzidos aproximadamente 25 kg de torta. A torta de filtro, juntamente com a vinhaça, tem largo emprego nos canaviais como fertilizante e composto orgânico (ANDRADE; DINIZ, 2007).

A matéria orgânica presente na torta de filtro traz grandes benefícios à canade-açúcar, sendo considerada um subproduto nobre dentro das usinas, dentre eles: 1. presença de micronutrientes na matéria orgânica; 2. os minerais nela contidos estão menos sujeitos a lixiviação; 3. aumento da CTC dos solos na região onde a torta é aplicada; 4. capacidade de reter maiores quantidades de água, que podem

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Informação fornecida por Sr. Luiz Henrique Franco de Campos, em 2014.

suprir deficiências hídricas, principalmente na brotação; 5. propicia melhores condições físico-químicas e microbiológicas para o desenvolvimento da planta (PENATTI, 1991). Segundo Almeida Júnior et al. (2011), a aplicação de torta de filtro promove uma melhoria na fertilidade do solo em virtude do aumento nos teores de macro e micronutrientes, na redução dos teores de Al, e também é favorável as plantas de cana-de-açúcar quando usada como composto orgânico.

A quantidade de torta de filtro aplicada nos canaviais da Usina de estudo é de aproximadamente 16 t·ha<sup>-1</sup>, no plantio de cana-de-açúcar.

### 2.5 Aplicação de palha na cultura de cana-de-açúcar

O uso da palha da cana deixada sobre o solo após a colheita, principalmente nas áreas mecanizadas, vem otimizando o processo de fertilização em termos de reciclagem de nutrientes e proteção do solo (UNICA, 2011). Mesmo depois de colhida, a palha depositada protege o solo da erosão. A presença da palha no campo também reduz a incidência de energia luminosa sobre o solo, inibindo o processo de fotossíntese e a germinação de algumas plantas daninhas, presentes no banco de sementes do solo (ANDRADE; DINIZ, 2007). Em estudo realizado por Moitinho et al. (2013), foi demonstrado que manejos conservacionistas do solo em áreas de cana-de-açúcar com a permanência dos resíduos sobre sua superfície, sem distúrbio, são estratégias eficientes para a redução das emissões de CO<sub>2</sub> do solo, pois a cobertura vegetal propiciada pela palhada da cultura auxilia na preservação da umidade e favorece menores temperaturas na superfície do solo.

Na Usina de estudo, 82% da colheita é mecanizada, e em média são deixados ao solo de 6 a 8 t·ha<sup>-1</sup> de palha.

#### 2.6 Diuron e seus metabólitos

O herbicida diuron, [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia], pertence ao grupo químico das uréias substituídas e apresenta amplo espectro de ação, recomendado para aplicação em pré e pós-emergência inicial das plantas daninhas normalmente em misturas com outros herbicidas, como o hexazinone e paraquat. Apresenta absorção radicular e com menor intensidade foliar, seu mecanismo de ação é a inibição do fotossistema II e a meia-vida média no campo é de 90 dias (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

As principais características desta molécula relacionadas ao seu comportamento são a baixa solubilidade em água, 42 mg·L<sup>-1</sup> a 25°C, K<sub>OW</sub> de 589, pKa 0 (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011), K<sub>oc</sub> e K<sub>d</sub> para 1,83% de matéria orgânica de 145 e 1,44 L·kg<sup>-1</sup>, respectivamente, K<sub>oc</sub> e K<sub>d</sub> para 2,59% de matéria orgânica de 310 e 4,34 L·kg<sup>-1</sup>, respectivamente (CARBO et al. 2007), densidade de 1,5 g·ml<sup>-1</sup>, pressão de vapor de 1,15 x 10<sup>-3</sup> mPa a 25°C (GREEN; LEWIS; COLES, 2007). Segundo Dias (2012), o diuron foi classificado como pouco móvel para o solo Latossolo Vermelho eutrófico (LVe) e com mobilidade intermediária para o solo Neossolo Quartzarenico órtico (RQo).

Após sua aplicação no solo, é adsorvido pelos colóides inorgânicos e/ou matéria orgânica, sendo pouco lixiviável em solos argilosos, porém, lixiviável nos arenosos. É degradado principalmente pelos micro-organismos e perdas podem ocorrer por fotodecomposição quando exposto por vários dias ou semanas à radiação solar (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). Α fotodegradação significativamente importante apenas quando a molécula permanece na superfície do solo por vários dias ou semanas (HESS; WARREN, 2002). A sorção do diuron no solo tem sido atribuída, principalmente, a matéria orgânica. Um estudo realizado por Rocha (2003) mostrou que o comportamento sortivo do herbicida apresenta correlação significativa com os teores de matéria orgânica e CTC do solo.

Segundo dados da USEPA (2003), o diuron é persistente e estável a hidrólise em pH 5, 7 e 9. Sua meia vida em estudos laboratoriais de metabolismo em solo aeróbico e anaeróbico é de 372 e 1000 dias, respectivamente.

Entretanto, em um sistema laboratorial aquático, a degradação ocorreu com uma meia vida de 33 e 5 dias em sistema aeróbico e anaeróbico, respectivamente. Em solos, a meia vida do diuron e seu metabólito DCPMU variaram de 73 a 139 dias e 217 a 1733 dias, respectivamente.

Em estudos de fotodegradação aquosa e em solo, a meia vida do diuron foi calculada em 43 e 173 dias, respectivamente. Em água, os produtos de degradação da fotólise são dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e no mínimo 13 produtos polares menores. No solo, o metabólito com maior degradação foi o DCPMU, e os metabólitos com menor degradação foram DCPU, 3,4-DCA, e 3,3',4,4'-tetrachlorobenzene (TCAB). A meia vida em estudos de metabolismo de solo aeróbico e anaeróbico foi de 372 (aeróbico) e 1000 (anaeróbico) dias. Sob condições aeróbicas, a maior quantidade de produto de degradação foi o DCPMU, e a menor quantidade de produtos de degradação foram o DCPU e CO<sub>2</sub>. Sob condições anaeróbicas, o único produto de degradação foi o DCPMU (USEPA, 2003).

O diuron é um composto cancerígeno, e a sua degradação parcial pode conduzir a metabólitos potencialmente problemáticos, onde, por exemplo, o 3,4-dichloroanilina (3,4-DCA) tem sido descrito como ainda mais prejudicial para organismos não-alvo que o próprio diuron (TIXIER et al., 2001).

A rota de degradação e mineralização do diuron e formação de metabólitos é apresentada na Figura 1 e as informações dos principais metabólitos do diuron são apresentadas na Tabela 1.

CI CH<sub>3</sub> 
$$\rightarrow$$
 CI CH<sub>3</sub>  $\rightarrow$  CI CH<sub>3</sub>  $\rightarrow$  Diuron  $\rightarrow$  DCPMU  $\rightarrow$  CI  $\rightarrow$  NH<sub>2</sub>  $\rightarrow$  CI  $\rightarrow$  NH<sub>2</sub>  $\rightarrow$  CI  $\rightarrow$  NH<sub>2</sub>  $\rightarrow$  DCPU

Figura 1 - Rota de degradação do diuron e formação de metabólitos. Adaptado de Sørensen et al. (2013).

Tabela 1 - Informações dos principais metabólitos do diuron

Principais metabólitos do diuron						
Nome	DCPMU	DCPU	3,4-DCA			
Nome químico	1-(3,4-dichlorophenyl)-1- methylurea	3,4- dichlorophenylurea	3,4-dichloroanilina			
Fórmula molecular	$C_8H_8CI_2N_2O$	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	$C_6H_5Cl_2N$			
Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	219,07	205,04	162,02			
Solubilidade em água a 20°C (mg l <sup>-1</sup> )	490	940	580			
Coeficiente de partição octanol- água em pH 7 e 20°C (logK <sub>ow</sub> )	-	2,35	2,69			
Número CAS	3567-62-2	2327-02-8	95-76-1			

Fonte: FOOTPRINT - Green, Lewis e Coles (2007).

#### 2.7 Hexazinone e seus metabólitos

O herbicida hexazinone (3-cyclohexyl-6-(dimethylamino)-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione) é um herbicida sistêmico, pertence a classe das triazinonas sendo registrado para o controle de plantas daninhas em pré e pósemergência inicial na cultura da cana-de-açúcar. É um herbicida residual e de contato, absorvidos prontamente pelas folhas e pelas raízes e é um produto extremamente tóxico (LORENZI, 2000). Seu mecanismo de ação é a inibição do fotossistema II, sofre degradação pelos micro-organismos do solo e é suscetível à fotodegradação (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

As principais características desta molécula relacionadas ao seu comportamento são: alta solubilidade em água, 33000 mg·L<sup>-1</sup> a 20°C, pressão de vapor de 0,03 mPa a 25°C, densidade de 1,25 g·ml<sup>-1</sup> (GREEN; LEWIS; COLES, 2007; RODRIGUES; ALMEIDA, 2011), logK<sub>ow</sub> de 1,20, persistência relativa nos solos (meia-vida de dissipação de 30 a 180 dias) (CHRISTOFFOLETI et al., 2005), e pKa de 0 (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). K<sub>OC</sub> e K<sub>d</sub> para 1,07% de matéria orgânica de 30 L·kg<sup>-1</sup> e 0,18 L·kg<sup>-1</sup>, respectivamente, K<sub>OC</sub> e K<sub>d</sub> para 2,68% de matéria orgânica de 52 L·kg<sup>-1</sup> e 0,75 L·kg<sup>-1</sup>, respectivamente (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2001). Segundo Dias (2012), o hexazinone foi classificado como móvel para o solo LVe e muito móvel para o solo RQo.

A rota de degradação e mineralização do hexazinone e formação de metabólitos é apresentada na Figura 2 e as informações dos principais metabólitos do hexazinone são apresentadas na Tabela 2.

Figura 2 - Rota de degradação da hexazinone e formação de metabólitos. Adaptado de Fischer e Michael (1995).

Tabela 2 - Informações dos principais metabólitos do hexazinone

-		Principais metal	bólitos do hexazinone			
Nome	Α	В	С	D	E	G
Nome químico	3-(4- hydroxycyclohexyl)-6- (dimethylamino)-1- methyl-1,3,5-triazine- 2,4(1H,3H)dione	3-cyclohexyl-6- (methylamino)-1- methyl-1,3,5-triazine- 2,4-(1H,3H)-dione	3-(4- hydroxycyclohexyl)-6- (methylamino)-1- methyl-1,3,5-triazine- 2,4(1H,3H)-dione	3-cyclohexyl-1- methyl-1,3,5-triazine- 2,4,6(1H,3H,5H)trione	3-(4- hydroxycyclohexyl)1- methyl-1,3,5-triazine- 2,4,6(1H,3H,5H)trione	3-cyclohexyl- 6- (methylamino)-1,3,5- triazine- 2,4(1H,3H)dione
Fórmula molecular	$C_{12}H_{20}N_4O_3$	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	$C_{11}H_{18}N_4O_3$	$C_{10}H_{15}N_3O_3$	$C_{10}H_{15}N_3O_4$	$C_{10}H_{16}N_4O_2$
Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	268,16	238,14	254,13	225,11	241,24	224,12
Número CAS	72576-13-7	56612-22-7	72585-88-7	-	72576-14-8	

Fonte: Fischer e Michael (1995).

#### 2.8 Metribuzin e seus metabólitos

O herbicida metribuzin (4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methythio -1,2,4 – triazin-5-one), pertence ao grupo químico das triazinonas, e é registrado no Brasil para controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar com aplicação em condições de pré e pós emergência inicial. É um herbicida seletivo e de largo espectro de ação contra plantas daninhas de folhas largas. Apresenta absorção radicular, com moderada absorção foliar quando em pós-emergência (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

A absorção do metribuzin pela planta é tanto pelas raízes quanto pelas folhas, e dentro do tecido vegetal, o metribuzin é translocado até os cloroplastos, agindo como inibidor do fotossistema II. Segundo Rodrigues e Almeida (2011), o metribuzin é um pó cristalino de cor branca, não inflamável às temperaturas normais de uso e armazenagem, de fórmula molecular  $C_8H_{14}N_4OS$  e possui as seguintes características físico-químicas: constante de dissociação (pKa) de 1,0, coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) de 44,7, coeficiente de sorção ( $K_{oc}$ ) médio de 60 mL·g<sup>-1</sup> de solo. Possui densidade de 1,26 g·ml<sup>-1</sup>, pressão de vapor de 0,121 mPa a 25°C e solubilidade em água de 1165 mg·L<sup>-1</sup> a 20°C (GREEN; LEWIS; COLES, 2007). Segundo estudo realizado por Singh et al. (2012), o valor de  $K_d$  para o metribuzin variou entre 0,22 e 6,96 para três diferentes tipos de solo, e o valor de  $K_{oc}$  permaneceu entre 56,4 e 1831,6. Segundo Dias (2012), o metribuzin foi classificado com mobilidade intermediária para o solo LVe e móvel para o solo RQo.

Segundo a USEPA (1998), as principais vias de degradação de metribuzin e seus principais produtos de degradação (DK e DADK) são o metabolismo microbiano e a degradação fotolítica em solo. Estes compostos permanecem disponíveis para a lixiviação para as águas subterrâneas e para o escoamento superficial. Isto é porque o metribuzin e os seus produtos de degradação não são voláteis.

Além disso, embora a velocidade de fotodegradação seja rápida para produtos químicos expostos, apenas cerca de 1 milímetro a parte superior do solo é realmente exposta à luz solar. Uma vez na água subterrânea, o metribuzin deverá persistir devido à sua estabilidade à hidrólise e à falta de penetração da luz (USEPA, 1998).

O metribuzin é muito estável à hidrólise e relativamente estável ao metabolismo do solo aeróbio e anaeróbio ( $t_{1/2}$  é de 106 e 112 dias, respectivamente). Mesmo que a fotólise direta em água e em solo parecem degradar rapidamente o metribuzin em laboratório ( $t_{1/2}$  de 4,3 horas e 2,5 dias), apenas o metribuzin que está na superfície do solo é influenciado pela fotólise. Por essa razão, a persistência no solo parece ser mais afetada pelo metabolismo do solo (aeróbio e anaeróbio) do que por fotólise, com meias-vidas de campo de 40-128 dias. Devido ao potencial de escoamento, a fotólise em  $H_2O$  tem resultados críticos (USEPA, 1998).

A rota de degradação e mineralização da metribuzin e formação de metabólitos é apresentada na Figura 3 e as informações dos principais metabólitos do metribuzin são apresentadas na Tabela 3.

Figura 3 - Rota de degradação da metribuzin e formação de metabólitos. Adaptado de Roberts (2001).

Tabela 3 - Informações dos principais metabólitos do metribuzin

Principais metabólitos do metribuzin						
Nome	DADK	DA	DK	4	6	
Nome químico	Desamino-diketo- metribuzin	Desamino- metribuzin	Diketo- metribuzin	-	-	
Fórmula molecular	$C_7H_{11}N_3O_2$	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> OS	$C_7H_{12}N_4O_2$	$C_8H_{14}N_4O_2S$	$C_8H_{13}N_3O_2S$	
Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	169,18	199,07	184,19	230,08	215,07	
Solubilidade em água a 20°C (mg l <sup>-1</sup> )	5350	-	1650	-	-	
Número CAS	52236-30-3	35045-02-4	56507-37-0	-	-	

Fonte: FOOTPRINT – Green, Lewis e Coles (2007).

# 2.9 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massa quadrupole time-of-flight

Desde o início da cromatografia líquida, em 1950, até os dias atuais, muitos avanços foram alcançados e todos impulsionados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fases estacionárias capazes de gerar colunas mais seletivas, eficientes e estáveis química e mecanicamente (MALDANER; JARDIM, 2009).

A etapa de separação cromatográfica pode ser demorada quando analisadas grandes quantidades de compostos em matrizes complexas. Na tentativa de contornar este problema várias estratégias têm sido adotadas, dentre elas, o uso de colunas recheadas com partículas de tamanho inferior a 2 µm, denominada cromatografia líquida de ultra eficiência (ultra performance liquid chromatography – UPLC) (MALDANER; JARDIM, 2009; YU et al., 2006). Uma das vantagens do uso de partículas menores que 2 µm é que a eficiência da coluna pode ser mantida com a diminuição do seu comprimento. Colunas menores permitem separações mais rápidas, uma vez que o tempo de separação é proporcional ao comprimento da coluna. Além disso, a utilização de uma coluna menor consome menor quantidade de solvente e de amostra (MALDANER; JARDIM, 2009).

A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa têm demonstrado ser uma técnica valiosa na análise de resíduos de agrotóxicos de misturas e matrizes complexas, fornecendo respostas analíticas mais rápidas com uma maior sensibilidade em comparação com os métodos de cromatografia líquida tradicionais. Essa combinação fornece vantagens significativas em relação à seletividade, sensibilidade e velocidade (FRENICH et al., 2008). Segundo Queiroz et al. (2012), não somente há o aumento da eficiência, mas também se obtém uma melhor resolução, um menor tempo de análise e uma melhor detectabilidade.

O espectrômetro de massa QTOF é um quadrupolo híbrido de tempo de voo (time-of-flight - TOF) com capacidade MS/MS (tandem mass spectrometry). O quadrupolo é operado como um quia de íons no modo MS e como um dispositivo de seleção de massa no modo MS/MS. Um analisador TOF é colocado ortogonalmente ao quadrupolo e serve como um dispositivo de resolução de massa para ambos os modos MS/MS e MS. Uma célula de colisão está localizada entre o quadrupolo e o analisador TOF para induzir a fragmentação no MS/MS. O detector final é uma placa de micro canais com alta sensibilidade. É extremamente rápido, possui alta capacidade de resolução, é altamente sensível a técnicas que toleram substâncias indesejáveis e permite a identificação dos metabólitos sem a utilização de padrões (SILVA-STENICO et al., 2009). Sua aplicação é bastante ampla, especialmente quando alta resolução é necessária e a faixa de massas que analisa é ampla (LANÇAS, 2013). Oferece alta resolução para o íon precursor e íons produto, o que constitui na identificação da massa molecular com quatro casas decimais (PASCHOAL et al., 2009). Segundo Vessecchi et al. (2011), o TOF é um instrumento que separa íons por m/z em uma região livre de campo após aceleração por uma voltagem de aceleração fixa. lons com a mesma energia translacional inicial e diferente m/z levam tempos diferentes para atravessar uma dada distância em uma região livre de campo. Em outras palavras, o tempo necessário para um íon atravessar o tubo será inversamente proporcional à raiz quadrada da razão m/z (também por simplicidade é comum assumir-se que é proporcional à massa), uma vez que a distancia entre a formação do íon e o detector é fixa (depende do comprimento do tubo) (LANÇAS, 2013).

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

# 3.1 Remobilização

O estudo foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo), localizado em Piracicaba, SP, Brasil.

## 3.1.1 Equipamentos e Vidrarias

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Gehaka BG 4400, estufa Tecnal TE-394/2, centrífuga Hitachi CF16RXII, mesa agitadora (tipo orbital) Tecnal TE 140, oxidador de amostras biológicas Harvey OX-500, ultrassom Branson 2510R-DTA, moinho para solos Marconi, aplicador automático para placas de TLC Camag Lonimat IV, analisador linear automático de TLC (Scanner) Berthold Tracemaster 40, analisador de cintilação líquida Perkin Elmer Tricarb 2910 TR, cyclone plus Perkin Elmer C431200, monitor de radiação Herfurht Minicont H1370W, micropipetas, vials de cintilação, frascos biométricos tipo Bartha, béqueres, provetas, balões volumétricos, e pipetas volumétricas.

#### 3.1.2 Condução do experimento

Foram utilizados dois tipos de solo contrastantes, Latossolo Vermelho eutrófico (LVe) e Neossolo Quartzarenico órtico (RQo) os quais foram coletados em 2011 e aplicado herbicidas radiomarcados com <sup>14</sup>C, utilizados no Projeto de Pesquisa "Comportamento e modelagem matemática dos herbicidas ametrina, diuron, glifosato, hexazinone e metribuzin aplicados em solos", para estudo de degradação destes produtos, e foram conduzidos de acordo com o método descrito na norma "Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil" (OECD, 2002). Estes solos foram utilizados por que apresentavam quantidades conhecidas de resíduos ligados de <sup>14</sup>C-herbicidas no solo, e se apresentavam estéreis, devido as extrações com

solventes realizadas no estudo acima citado, possibilitando assim o presente estudo sobre a remobilização dos herbicidas diuron, hexazinone, diuron + hexazinone e metribuzin.

A nova coleta das amostras de solo foi realizada nas mesmas coordenadas geográficas (LVe: 22°34.985' S e 47°33.988' O; e RQo: 22°14.367' S e 47°43.100' O) para restaurar a atividade microbiana dos solos estéreis com os resíduos ligados. A profundidade de coleta foi de 0 a 0,10 m (primeira camada do solo) após a retirada da cobertura vegetal, e os solos foram peneirados em peneiras de 1,7 mm.

Foram realizados 4 tratamentos após a mistura dos solos natural e radiomarcado: adição de vinhaça, adição de torta de filtro, adição de palha de canade-açúcar e sem adição de substrato. A vinhaça, torta de filtro e palha de cana-de-açúcar foram fornecidas por uma usina da região de Piracicaba – SP. A vinhaça utilizada no estudo foi a mesma utilizada diretamente nos canaviais, ou seja, diluída em água amoniacal e a quantidade aplicada foi determinada considerando a norma P4.231 da CETESB (2006).

Os solos, a vinhaça, a torta de filtro e a palha de cana-de-açúcar foram analisados no Laboratório Agrotécnico Piracicaba Ltda, e os dados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Principais atributos físicos e químicos dos solos utilizados no experimento

Doughmotivos	9	Solo
Parâmetros	LVe	RQo
Areia (g⋅kg <sup>-1</sup> )	170	900
Silte (g⋅kg <sup>-1</sup> )	142	13
Argila (g⋅kg <sup>-1</sup> )	688	87
pH CaCl₂	4,9	5,0
M.O. (g·dm <sup>-3</sup> )	25,0	19,0
SB (mmol <sub>c</sub> ·dm <sup>-3</sup> )	42,0	19,0
CTC (mmol <sub>c</sub> ·dm <sup>-3</sup> )	80,0	47,0
V (%)	53,0	40,0
P (mg·dm <sup>-3</sup> )	50,0	13,0
K (mmol <sub>c</sub> ·dm <sup>-3</sup> )	7,3	0,8
Ca (mmol <sub>c</sub> ·dm <sup>-3</sup> )	23,0	14,0
Mg (mmol <sub>c</sub> ·dm <sup>-3</sup> )	12,0	4,0
H+Al (mmol <sub>c</sub> ·dm <sup>-3</sup> )	38,0	28,0
Al (mmol <sub>c</sub> ·dm <sup>-3</sup> )	1,0	0

Tabela 5 - Atributos químicos da vinhaça, torta de filtro e palha de cana-de-açúcar

		Vinhaça	Torta de filtro	Palha de cana
Nitrogênio (N)	g/kg	0,68	11,2	5,6
Fósforo (P)	g/kg	0,11	10	0,7
Potássio (K)	g/kg	2,27	3,93	9
Cálcio (Ca)	g/kg	0,78	26,75	3,7
Magnésio (Mg)	g/kg	0,27	3,18	1,1
Enxofre (S)	g/kg	0,46	8,25	3
Matéria Orgânica	g/kg	-	455,09	-
Umidade	%	-	3,83	-
Carbono Orgânico	%	3,92	-	-

O histórico de aplicação dos herbicidas nas glebas coletadas é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Histórico de uso de herbicidas onde os solos foram coletados

Solo	Insumo	Data (dd/mm/aaaa)	Área	Produto Total Consumido	Consumo Médio (dose)
	Sulfentrazone	20/12/2011	140,21	174,10	1,24
	Clomazone	20/12/2011	35,50	65,00	1,83
	Ametryn	20/12/2011	140,21	235,18	1,68
LVe	S-metolachlor	20/12/2011	104,71	264,72	2,53
LVE	Glyphosate	07/12/2011	55,25	305,74	5,53
	2,4- D Amina	07/12/2011	55,25	107,91	1,95
	Sulfentrazone	07/12/2011	55,25	116,00	2,10
	Clomazone	07/12/2011	55,25	77,34	1,40
RQo	Sulfentrazone	10/05/2012	60,00	82,00	1,37
NQU	Tebuthiuron	10/05/2012	60,00	129,00	2,15

Foram utilizados os solos de dois tempos de extração (56 e 70 dias) do estudo de degradação já finalizado, para a avaliação de todos os herbicidas. Os solos foram misturados e utilizados juntamente, pois nesses tempos apresentaram maior quantidade de formação de resíduo ligado. Na Tabela 7 é apresentada a atividade específica, pureza, e quantidade de resíduos ligados nos tempos utilizados.

Tabela 7 - Atividade específica, pureza, quantidade de resíduos ligados nos solos nos tempos 56 e 70 dos herbicidas utilizados no estudo de remobilização

Solo	Herbicidas	Atividade específica (MBq·mg)	Pureza (%)	Quantidade <sup>14</sup> C somatória dos tempos 56 e 70 (Bq·g de solo)
	<sup>14</sup> C – Diuron	2,43	98,70	165,39
	<sup>14</sup> C - Diuron + hexazinone	2,43	98,70	134,47
LVe	<sup>14</sup> C - Hexazinone	3,14	99,80	101,70
	<sup>14</sup> C - Metribuzin	2,30	97,01	206,91
	<sup>14</sup> C – Diuron	2,43	98,70	206,66
	<sup>14</sup> C - Diuron + hexazinone	2,43	98,70	119,86
RQo	<sup>14</sup> C - Hexazinone	3,14	99,80	66,37
	<sup>14</sup> C - Metribuzin	2,30	97,01	119,49

Antes do início do estudo foram determinadas a umidade (item 3.1.3), capacidade de campo (item 3.1.4), quantidade de solo (base seca) a ser pesada e acondicionada nos frascos de Bartha (item 3.1.5) e volume de água a ser adicionado aos frascos para se atingir 75% da capacidade de campo (item 3.1.6) para os dois tipos de solo.

#### 3.1.3 Determinação da umidade nas amostras de solo (U)

Primeiramente, três placas de Petri  $(m_p)$  foram pesadas e foram adicionadas 10 g de solo úmido. As placas foram novamente pesadas e observou-se a massa total (placa + solo úmido). Após este procedimento, levou-se as placas para a estufa a  $105 \pm 1^{\circ}$ C, por 24 horas. Após este período as placas foram retiradas da estufa e colocadas no dessecador até que atingissem a temperatura ambiente. Após o resfriamento, as placas foram pesadas novamente (placa + solo seco).

A umidade da amostra de solo foi calculada pela diferença entre os pesos das amostras úmidas e secas, utilizando-se a Equação 2 de acordo com OECD (2002):

$$U(kg \cdot kg^{-1}) = \frac{(m_{p} + m) - (m_{p} + m_{s})}{(m_{p} + m_{s}) - (m_{p})}$$
(2)

Onde:

m<sub>p</sub> = massa da placa de Petri (g);

m<sub>p</sub> + m = massa do placa + massa do solo úmido (g);

 $m_p + m_s = massa da placa + massa do solo seco (g);$ 

U = umidade da amostra de solo (kg·kg<sup>-1</sup>).

### 3.1.4 Capacidade de campo nas amostras de solo (CC)

A capacidade de campo foi determinada pela técnica TSFM (torrão separado pela frente de molhamento), descrita por Costa (1983), onde se coloca solo seco ao ar peneirado em peneira de 1,7 mm em um Becker de 500 ml até completar o volume. Goteja-se 2 mL de água destilada em 10 segundos. Após 10 segundos (procedimento realizado para três repetições), o torrão úmido formado é separado do resto do solo com o auxílio de uma pinça curva e colocado em uma placa de Petri sendo levadas à estufa a  $60 \pm 1^{\circ}$ C por 24 horas.

Após o período de secagem o torrão foi pesado e a capacidade de campo foi calculada pela diferença entre os pesos das amostras úmidas e secas, utilizando-se a Equação 3:

$$CC(\%) = \frac{(m_p + m) - (m_p + m_s)}{(m_p + m_s) - (m_p)} \times 100$$
(3)

Onde:

m<sub>p</sub> = massa da placa de Petri (g);

 $m_p + m = massa do placa + massa do solo úmido (g);$ 

 $m_p + m_s = massa da placa + massa do solo seco (g);$ 

CC = capacidade de campo (%).

### 3.1.5 Determinação da quantidade de solo a ser pesado

De acordo com a OECD (2002), o experimento de degradação e mineralização deve ser preparado com 50 g de solo (base seca) e para a determinação do peso real do solo úmido (equivalente a 50 g de solo seco), a quantidade de solo a ser pesado e acondicionado no frasco biométrico tipo Bartha, para cada tipo de solo, deve ser determinada através da Equação 4:

$$\mathbf{m} = (1 + \mathbf{U}) \times \mathbf{m}_{s} \tag{4}$$

Onde:

m = massa de solo, na umidade atual, a ser pesada (g);

 $m_s$  = massa de solo seco desejada (g);

U = umidade atual da amostra de terra (kg·kg<sup>-1</sup>).

O total de massa de solo seco foi de 50 g (25 g do solo natural + 25 g do solo radiomarcado), e a quantidade de solo úmido utilizado foi de 56,13 g para o solo LVe (25 g de solo radiomarcado + 31,13 g de solo natural), e 51,82 g para o solo RQo (25 g de solo radiomarcado + 26,82 g de solo natural).

### 3.1.6 Determinação do volume de água a ser adicionado aos frascos

Para a montagem dos estudos, as amostras de solo utilizadas devem conter 75% da capacidade de campo, e para isto é necessária a adição de água ao solo. Assim, foi utilizada a Equação 5 para determinar a quantidade de água a ser adicionada. Caso o cálculo seja negativo, o solo deve ser exposto ao ar para perder água.

$$V_{a} = \left\lceil \frac{\left(CC \times 0.75\right)}{100} - U \right\rceil \times m_{s} \tag{5}$$

Onde:

V<sub>a</sub> = volume de água a ser adicionado à amostra de terra (mL);

CC = capacidade de campo (%);

U = umidade atual da amostra de terra (kg·kg<sup>-1</sup>);

m<sub>s</sub> = massa de solo seco (g).

#### 3.1.7 Montagem do experimento

Os cálculos de teor de umidade das amostras, capacidade de campo, quantidade de solo a ser pesada e volume de água a ser adicionado nos frascos foram feitos separadamente para os solos radiomarcado (do estudo de degradação finalizado) e para o natural (coletado para restaurar a atividade microbiana), conforme Tabela 8.

Em frascos biométricos de 300 mL, foi adicionado 56,13 g de solo LVe (25 g de solo radiomarcado e 31,13 g de solo natural), e 51,82 g de solo RQo (25 g de solo radiomarcado e 26,82 g de solo natural), separadamente. Em seguida, foi misturado aos frascos a vinhaça, palha de cana-de-açúcar, torta de filtro e um tratamento sem aplicação de substrato, separados em frascos por herbicida, por tipo de solo e por tratamento.

Tabela 8 - Teor de umidade, capacidade de campo, massa de solo e volume de água adicionado nos frascos de Bartha para os dois tipos de solos

Solos	Teor de umidade (U) <sup>*</sup> kg·kg <sup>-1</sup>	Capacidade de campo (CC) <sup>*</sup>	Massa de solo (m) <sup>*</sup> G	Volume de água (V <sub>a</sub> ) <sup>*</sup> mL
LVe natural	0,245	35,22	31,13	0,48
LVe radiomarcado	0	35,22	25,00	6,60
RQo natural	0,073	23,94	26,82	2,69
RQo radiomarcado	0	23,94	25,00	4,49

<sup>\*</sup>Média de três repetições.

Para o solo RQo, a quantidade de vinhaça utilizada foi igual a quantidade de água que seria necessária para corrigir a umidade do solo, correspondendo a 170 m<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup>. Para os outros tratamentos do solo RQo e para os frascos com o solo LVe, o volume de água adicionado foi o volume apresentado na Tabela 8. Para o solo LVe, a quantidade de vinhaça aplicada foi de 100 m<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup>.

A quantidade de torta de filtro aplicada foi de 15 t·ha<sup>-1</sup> (para os dois solos) e para a palha de cana-de-açúcar foi de 10 t·ha<sup>-1</sup> (quantidades calculadas de acordo com o uso no campo) conforme Figura 4. As misturas dos solos com os substratos e com água foram homogeneizadas.

Em seguida, foi adicionado 10 mL de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH)  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  no tubo lateral do frasco de Bartha que foi fechados com uma tampa de borracha, acoplada a um filtro de "soda lime"; contendo rolha entre o filtro e o frasco (Figura 5). Os frascos foram incubados à  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em sala climatizada e no escuro, sendo a temperatura registrada diariamente.

Após a incubação, foram coletadas e trocadas as soluções de NaOH 0,2 mol·L<sup>-1</sup> nos períodos de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias após o início do experimento e a partir do NaOH retirado foram extraídas duas alíquotas de 1 mL acrescidas a 10 mL de solução cintiladora em frascos de cintilação líquida isentos de qualquer contaminação externa e colocadas para leitura no Espectrômetro de Cintilação Líquida (ECL), que expressa a quantidade de radiação na amostra, em

desintegrações por minuto. Após o último período de coleta (aos 70 dias), foram feitas as extrações dos herbicidas e seus metabólitos. Durante o estudo, checagens periódicas do conteúdo de água dos solos dos frascos biométricos foram feitas através da pesagem do frasco + solo. Se a diferença entre o conteúdo inicial de água e o determinado foi superior a 5%, ajustes foram feitos com a adição de água com a finalidade de manter o valor inicial da umidade de solo.



Figura 4 - Solo natural e radiomarcado com aplicação de palha de cana-de-açúcar antes da correção de umidade e homogeneização

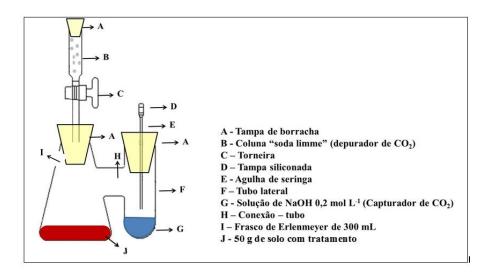


Figura 5 - Esquema de um frasco biométrico de Bartha com 50 g de solo incubado

### 3.1.8 Extrações

Os solventes orgânicos utilizados foram metanol (pureza 99,9%, grau HPLC, J. T. Baker) e clorofórmio (pureza 99,4%, Merck).

A extração do diuron, hexazinone e diuron + hexazinone foi realizada em três etapas. Na primeira extração, amostras de 50 g de solo foram retiradas dos frascos biométricos e transferidas para tubos de centrífuga (250 mL). Foi adicionado 100 mL de metanol, e agitado por 1 hora a 200 rpm em agitador horizontal. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e transferido para frascos de 500 mL. Para a segunda e terceira extração, o volume de metanol adicionado foi de 80 e 70 mL, respectivamente, e o restante do procedimento foi ao da primeira extração.

Para a extração do metribuzin foi realizada três extrações. Na primeira extração, amostras de 50 g de solo foram retiradas dos frascos de Bartha e transferidas para tubos de centrífuga (250 mL). Foi adicionado 60 mL de metanol, e os tubos foram agitados por 30 minutos a 200 rpm em agitador horizontal. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e transferido para frascos de 500 mL. Para a segunda extração foi adicionado 40 mL de metanol e para a terceira extração 40 mL de clorofórmio e o restante do procedimento foi igual ao da primeira extração.

Alíquotas de 1 mL do extrato das extrações foram pipetadas em *vials* de cintilação líquida com 10 mL de solução cintiladora para medição no Espectrômetro de Cintilação Líquida. Após a extração, as amostras de solo foram secas em estufa a 40°C e maceradas, sub amostras de 0,2 g foram queimadas em Oxidador Biológico e a radioatividade foi quantificada por ECL. Os extratos das três extrações de cada herbicida foram concentrados em rotaevaporador a 40°C e foi realizado estudos em placas de TLC, onde os compostos foram separados por cromatografia de camada fina.

### 3.2 Identificação dos metabólitos

O estudo de identificação dos metabólitos foi realizado no Departamento de Química Analítica, na Universidade de La Rioja, na Espanha. Para a identificação dos metabólitos, foi utilizado o equipamento UPLC®-QTOF (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massa *quadrupole time-of-flight*).

As extratos das amostras da remobilização foram filtrados em filtro de PTFE 45 µm e secos em TurboVap com nitrogênio no Laboratório de Ecotoxicologia e as amostras foram encaminhadas para análise na Espanha.

## 3.2.1 Reagentes e padrões

Os solventes orgânicos utilizados foram metanol (pureza > 99,99%, grau LC/MS, Optima<sup>®</sup>), acetona (pureza 99,96%; grau HPLC, Scharlau) e acetonitrila (pureza 99,9%, grau LC/MS, Scharlau).

Foram usados padrões dos herbicidas diuron (pureza 99,6%; Sigma-Aldrich, Alemanha), hexazinone (pureza 99,9%; Sigma-Aldrich, Alemanha) e metribuzin (pureza 99,9%; Sigma-Aldrich, Alemanha) para a construção da curva analítica.

### 3.2.2 Equipamentos, materiais e condições cromatográficas

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Sartorius BL120S, ultrassom Branson 5510, micropipetas Gilson (10-100µL; 100-1000µL; 500-5000µL), sistema de purificação de água (Milli-Q<sup>®</sup>). Foram utilizados filtros 0,22 µm de PTFE, balões volumétricos graduados, vials com insertos de 200 µL, tampas, e septos précortados. Para o estudo de hidrólise e oxidação, também foi utilizado medidor de pH Crison modelo GLP 22.

Os extratos das amostras da remobilização foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência, sistema Waters *Acquity* UPLC<sup>®</sup>, acoplada a espectrômetro de massa *quadrupole time-of-flight* (MicrOTOF-Q), Bruker, com fonte de ionização de eletrospray (Figura 6). Os herbicidas foram analisados utilizando ionização positiva.



Figura 6 - UPLC®-QTOF utilizado para qualificação dos metabólitos

Foi utilizada uma coluna Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C-18 (1,7 μm, 2,1 mm d.i. x 100 mm), temperatura de 40 °C e o seguinte gradiente de eluição: inicialmente 45% (v/v) da fase A (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) e B (solução aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico) com rampa linear até atingir 90% da fase A em 8,0 min; retornando a 45% de A em 8,5 min até 9,0 min. A vazão da fase móvel foi mantida a 0,3 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 7,5 μL (Adaptado de QUEIROZ et al., 2012). A análise dos dados foi realizada através do software *Bruker Compass DataAnalysis* para *micrOTOF* – versão 4.0 (*Build 234*).

Foi utilizado solução de Formiato de Sódio (NaCOOH) como calibrante interno do equipamento.

### 3.2.3 Preparo das amostras para análise

Para cada herbicida, as amostras de solo pré-extraídas foram secas juntas, pois de acordo com os resultados das leituras em placas de TLC, apresentaram os mesmos metabólitos, independente do tipo do solo ou do tratamento utilizado.

As amostras secas foram ressuspendidas e diluídas em diferentes solventes para análise. As amostras de diuron e diuron + hexazinone foram ressuspendidas em acetona, e as diluições foram feitas em metanol. A amostra de hexazinone foi ressuspendida e diluída em metanol. A amostra de metribuzin foi ressuspendida e diluída em acetonitrila, metanol e acetonitrila:metanol 50% (v/v). Todas as amostras foram filtradas em filtros ISO-DISC<sup>TM</sup> de PTFE de 4 mm x 0,2 μm.

## 3.2.4 Identificação dos compostos utilizando MicrOTOF-Q

Os compostos foram identificados através dos valores de massas, estruturas e características moleculares, e foi possível a identificação dos metabólitos nas amostras através de pesquisa na literatura.

Foram injetados os padrões dos herbicidas estudados na concentração de 10 ppm no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), para observar suas fragmentações numa voltagem de 35 eV. Foi possível observar que nenhuma das fragmentações dos padrões de herbicidas continha a mesma massa e tempo de retenção dos metabólitos, confirmando assim que os metabólitos não eram pertencentes a fragmentação do íon precursor.

### 3.2.5 Curva de calibração utilizando MicrOTOF-Q

Primeiramente foi pesado 2 mg de cada padrão analítico e diluído em 2 mL de metanol para diuron, e em acetonitrila para hexazinone e metribuzin. Foi preparada uma solução padrão individual dos padrões diuron, hexazinone e metribuzin na concentração de 1000 μg mL<sup>-1</sup>. A partir destas soluções foi feita diluições para a construção da curva de calibração nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 e 1 μg mL<sup>-1</sup> para diuron e hexazinone, e 0,025; 0,05; 0,1; 0,3; 0,6 e 0,8 μg mL<sup>-1</sup> para metribuzin. Todas as soluções foram filtradas em filtros de PTFE de 0,22 μm.

#### 3.2.6 Estudo de hidrólise

Segundo dados do USEPA (1994, 1998 e 2003), os herbicidas são estáveis a hidrólise a pH 5, 7 e 9. Então, o estudo teórico de hidrólise foi realizado em pH extremos e um neutro (2; 6 e 12) e a diferentes temperaturas (25 e 50°C) para tentar obter os mesmos metabólitos do estudo de degradação, e assim compará-los.

Primeiramente, foram feitas soluções padrão concentradas dos herbicidas utilizando uma balança analítica. Para os herbicidas hexazinone e metribuzin, os produtos foram dissolvidos em água Milli-q, e para o herbicida diuron, foi dissolvido em solução 50% (v/v) H<sub>2</sub>O:MeOH devido a sua baixa solubilidade em água. As soluções tampão foram preparadas segundo a Tabela 9.

Tabela 9 - Método de preparo das soluções tampão

рН	Método
2,0	25 ml KCl 0,2M + 6,5 ml HCl 0,2M em 100 ml
6,0	$0.25~{ m g~H(NH_4)_2C_6H_5O_7} + 300~{ m \mu L~NH_4OH~12,5\%~em~100~ml}$
12,0	2,5 ml KCl 0,2M + 6,5 ml NaOH 0,2M em 100 ml

Em cada frasco do estudo, foi colocado diferentes soluções tampão (pH 2; 6 e 12), com os diferentes herbicidas na concentração de 12 µg mL<sup>-1</sup>, e submetidos a diferentes temperaturas em estufa (25 e 50°C). Todo o experimento foi realizado na ausência de luz.

Durante o decorrer do experimento, foram coletadas amostras de 500  $\mu$ L das soluções em diferentes tempos (25 °C: 0, 8, 24, 96, 168, 576 e 720 h; e 50°C: 0, 4, 8, 12, 24, 48, 120, 360 e 672 h) passadas em filtro de PTFE 0,22  $\mu$ m e injetadas em UPLC®-QTOF.

## 3.2.7 Estudo de oxidação

Para o estudo de oxidação, foram feitas soluções com água oxigenada concentrada ( $H_2O_2$  35% (v/v)) e concentração de 12 µg mL<sup>-1</sup> dos herbicidas metribuzin e hexazinone. O estudo foi conduzido em 2 pHs diferentes, 2,28 (pH de  $H_2O_2$ ) e 6 (pH neutro), e mantido a 25°C em estufa durante 16 horas.

Foram coletadas amostras de 500  $\mu L$  das soluções em tempo inicial e no tempo de 16 horas, passadas em filtro de PTFE 0,22  $\mu m$  e injetadas em UPLC $^{\otimes}$ -QTOF.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os dados demostraram que os resíduos ligados podem ser remobilizados, ficando disponíveis na solução do solo para mineralização, e disponíveis para a extração química, variando em relação aos herbicidas. Foi possível observar que o balanço de massa final ficou entre 89,21% e 109,93%, dentro do intervalo esperado. Observando a Tabela 10, é possível verificar que para o solo LVe, o herbicida metribuzin teve a menor remobilização, com uma média de 74,98% de produto que permaneceu ligado ao solo e que o herbicida hexazinone foi o mais remobilizado (evolução do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> com média de 23,78%), conforme Tabela 10.

### 4.1 Análise estatística do estudo de remobilização

Foram ajustados modelos lineares generalizados do tipo gama (McCullagh e Nelder, 1989) com os efeitos de herbicida, tratamento e da interação entre herbicida e tratamento no preditor linear para cada variável em cada tipo de solo. As comparações múltiplas foram feitas por meio dos intervalos de confiança segundo a distribuição gama para as estimativas dos parâmetros do modelo. A qualidade do ajuste foi avaliada por meio do gráfico meio-normal com envelope simulado (Hinde e Demétrio, 1998). Todas as análises foram feitas no software R (R CORE TEAM, 2013).

A análise estatística foi realizada considerando as três análises realizadas (Evolução do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, Radioatividade extraída e Combustão) para o fechamento do balanço de massa e estão apresentadas nas Tabelas 11 a 16.

Tabela 10 - Balanço de massa final (porcentagem de radioatividade recuperada em relação ao aplicado)

Solo	Tratamento		Tempo de incubação (70 dias) % de radioatividade aplicada						
			Diuron	Diuron + Hexazinone	Hexazinone	Metribuzin			
		Evolução do 14CO <sub>2</sub>	5,11	4,14	18,26	4,24			
_	Vinhaça	Radioatividade extraída	34,38	37,88	37,63	17,95			
	Viiilaga	Combustão	58,72	60,03	41,98	76,05			
		Balanço de Massa	98,21	102,05	97,87	98,24			
		Evolução do 14CO <sub>2</sub>	5,65	4,43	21,24	4,29			
	Torta de filtro	Radioatividade extraída	35,44	38,26	34,61	17,18			
	Torta de Intro	Combustão	54,84	59,36	42,57	72,99			
LVe -		Balanço de Massa	95,93	102,04	98,42	94,46			
		Evolução do 14CO <sub>2</sub>	5,49	4,44	23,10	4,58			
	Palha de Cana	Radioatividade extraída	35,84	37,89	34,61	15,44			
	i ailia de Calla	Combustão	52,27	57,53	48,08	74,55			
		Balanço de Massa	93,60	99,86	105,79	94,57			
		Evolução do 14CO <sub>2</sub>	4,97	4,07	21,49	4,35			
	Tratamento sem aplicação	Radioatividade extraída	37,81	39,61	32,78	18,79			
		Combustão	67,15	58,36	43,83	76,33			
		Balanço de Massa	109,93	102,04	98,10	99,48			
		Evolução do <sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	3,61	5,70	16,16	6,56			
	Vinhaça	Radioatividade extraída	32,40	36,74	32,78	26,74			
	Viiiiaça	Combustão	67,15	48,84	40,27	65,41			
		Balanço de Massa	103,16	91,29	89,21	98,71			
		Evolução do 14CO <sub>2</sub>	7,66	17,26	46,67	8,14			
	Torta de filtro	Radioatividade extraída	31,15	28,58	32,83	19,56			
	Torta de Intro	Combustão	66,52	46,62	23,34	67,62			
RQo		Balanço de Massa	105,33	92,45	102,83	95,32			
NGO		Evolução do 14CO <sub>2</sub>	5,32	7,62	19,14	7,25			
	Palha de Cana	Radioatividade extraída	30,68	34,00	32,83	16,97			
	i ailia de Calla	Combustão	64,67	54,19	42,49	73,67			
		Balanço de Massa	100,68	95,81	94,45	97,89			
		Evolução do 14CO <sub>2</sub>	3,98	5,79	24,14	6,68			
	Tratamento	Radioatividade extraída	35,34	36,97	32,42	20,29			
	sem aplicação	Combustão	68,11	59,00	40,39	75,61			
		Balanço de Massa	107,43	101,76	96,94	102,58			

Tabela 11 – Análise estatística da evolução do  $CO_2$  para o solo LVe (interação herbicida x tratamento significativa:  $F_{9,16}$ = 5,1295, p= 0,0023)

Herbicida	Tratamento <sup>1/</sup>								
	Tratamento sem aplicação	Palha		Torta de filtro	)	Vinhaça			
Diuron	4.9709±0.0336 <sup>2/</sup> cB	5.4873±0.1519	abB	5.6530±0.1952	аВ	5.1122 <u>±</u> 0.0966	bcB		
Hexazinone	21.4856±0.0734 bA	23.1026±0.0913	aA	21.2362±0.2939	bΑ	18.2649±0.2067	сA		
Metribuzin	4.3550±0.0650 abC	4.5850±0.1250	аC	4.2600±0.0700	bC	4.2350±0.0350	bC		
Diuron + Hexazinone	4.0736±0.0572 bD	4.4418±0.0212	аC	4.4256±0.0652	aС	4.1404±0.0433	bC		

 $<sup>^{1/2}</sup>$ Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente na mesma linha e coluna, respectivamente (p = 0,05).  $^{2/2}$ Os valores das médias da evolução do CO₂ associado com o desvio padrão ( $^{\pm}$ DP) da média ( $^{n}$ =2).

Tabela 12 - Análise estatística da radioatividade extraída para o solo LVe (interação herbicida x tratamento significativa:  $F_{9,16}$ = 4,4120, p= 0,0048)

	Tratamento <sup>1/</sup>							
Herbicida	Tratamento sem aplicaçã	ão	Palha		Torta		Vinhaça	
Diuron	37,8029±0,6743 <sup>2/</sup> aA	A	35,8349±0,3135	aAB	35,4525±0,5775	aAB	34,3668±0,9199	aA
Hexazinone	37,5880±0,2870 aA	Α	32,4169±0,4497	bB	32,7798±0,9049	bB	37,6293±0,2866	aA
Metribuzin	18,7900±0,0200 aE	В	15,4350±0,3950	bC	17,1800±0,3000	аC	17,9450±0,0150	аВ
Diuron + Hexazinone	39,6079±0,2225 aA	Α	37,8941±0,7254	aA	38,2592±3,0479	aA	37,8756±1,1504	aA

 $<sup>^{1/2}</sup>$ Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente na mesma linha e coluna, respectivamente (p = 0,05).  $^{2/2}$ Os valores das médias da radioatividade extraída associado com o desvio padrão ( $\pm$ DP) da média (n=2).

Tabela 13 - Análise estatística da combustão para o solo LVe (interação herbicida x tratamento significativa:  $F_{9,16}$ = 5,3044, p= 0,0019)

Hawkinida	Tratamento <sup>1/</sup>								
Herbicida	Tratamento sem aplicação	Palha		Torta	4 bC 41,9795±0,7392 b				
Diuron	57,2039±0,4467 <sup>2/</sup> aB	52,2675±0,1681	bC	54,8389±0,8104	abB	58,7228±0,7927	аВ		
Hexazinone	43,8301±0,3035 bC	48,0769±0,0702	аD	42,5723±2,0304	bC	41,9795±0,7392	bC		
Metribuzin	76,3300±0,0800 aA	74,5450±2,5950	aA	72,9850±0,7450	aA	$76,0550 \pm 0,2250$	aA		
Diuron + Hexazinone	58,3620±0,6255 aB	57,5264±1,5146	аВ	59,3563±0,5660	aВ	60,0295±2,0023	аВ		

 $<sup>^{1/}</sup>$ Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente na mesma linha e coluna, respectivamente (p = 0,05).  $^{2/}$ Os valores das médias da combustão associado com o desvio padrão ( $\pm$ DP) da média (n=2).

Tabela 14 - Análise estatística da evolução do  $CO_2$  para o solo RQo (interação herbicida x tratamento significativa:  $F_{9,16}$ = 43,0610, p< 0,0001)

Howhielde	Tratamento <sup>1/</sup>								
Herbicida	Tratamento sem aplicação	Palha		Torta de filtro	)	Vinhaça			
Diuron	$3,9849\pm0,0897^{2/}$ cC	5,3190±0,1864	bC	7,6552±0,6751	аC	3,6084±0,0460	сС		
Hexazinone	24,1383±1,6092 bA	19,1385±0,6205	cA	46,6661±3,0087	aA	16,1615±0,0132	dA		
Metribuzin	6,6800±0,1100 bB	7,2500±0,1100	abB	8,1400±0,0600	аC	6,5600±0,1800	bB		
Diuron + Hexazinone	5,7924 <u>±</u> 0,0861 cB	7,6169±0,3656	bB	17,2590±0,9520	аВ	5,7013±0,0388	cВ		

 $<sup>^{1/}</sup>$ Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente na mesma linha e coluna, respectivamente (p = 0,05).  $^{2/}$ Os valores das médias da evolução do CO<sub>2</sub> associado com o desvio padrão ( $\pm$ DP) da média (n=2).

Tabela 15 - Análise estatística da radioatividade extraída para o solo RQo (interação herbicida x tratamento significativa: F<sub>9,16</sub>= 13,5260, p< 0,0001)

Llambiaida	Tratamento <sup>1/</sup>									
Herbicida	Tratamento sem aplicação	Palha		Torta		Vinhaça				
Diuron	35,3430±1,2739 <sup>2/</sup> aA	30,6834±0,6001	аВ	31,1533±1,8102	aA	32,4013±0,9495	аВ			
Hexazinone	35,8344 <u>±</u> 0,5098 bA	35,7161±2,7348	bA	23,0874±0,6423	cВ	41,6985±0,5565	aA			
Metribuzin	20,2900 <u>±</u> 1,0600 bB	16,9650±0,0050	bC	19,5600±1,0500	bC	26,7400±1,1600	аC			
Diuron + Hexazinone	36,9665+0,1219 aA	33,9998±0,6489	aAB	28,5753±0,4066	bΑ	36,7433±0,5257	aAB			

 $<sup>^{1/}</sup>$ Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente na mesma linha e coluna, respectivamente (p = 0,05).  $^{2/}$ Os valores das médias da radioatividade extraída associado com o desvio padrão ( $^{\pm}$ DP) da média ( $^{n}$ =2).

Tabela 16 - Análise estatística da combustão para o solo RQo (interação herbicida x tratamento significativa: F<sub>9,16</sub>= 6,4720, p= 0,0006)

Hambiaida	Tratamento <sup>1/</sup>								
Herbicida	Tratamento sem aplicação	Palha		Torta		Vinhaça			
Diuron	68,1057 <u>±</u> 2,1763 <sup>2/</sup> aAB	64,6740±1,0355)	аА	66,5237±0,6203	аА	67,1485±1,4309	aA		
Hexazinone	40,3856±0,0781 aC	42,4891±0,6397)	аC	23,3367±0,7596	bC	40,2687±2,9150	аВ		
Metribuzin	75,6050 <u>±</u> 2,8150 aA	73,6700±4,2700)	aA	67,6200±6,1000	aA	65,4100±5,8200	aA		
Diuron + Hexazinone	58,9975 <u>±</u> 1,1812 aB	54,1933±2,4768)	abB	46,6194±5,4507	bB	48,8409±4,8824	abB		

 $<sup>^{1/}</sup>$ Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente na mesma linha e coluna, respectivamente (p = 0,05).  $^{2/}$ Os valores das médias da combustão associado com o desvio padrão ( $\pm$ DP) da média (n=2).

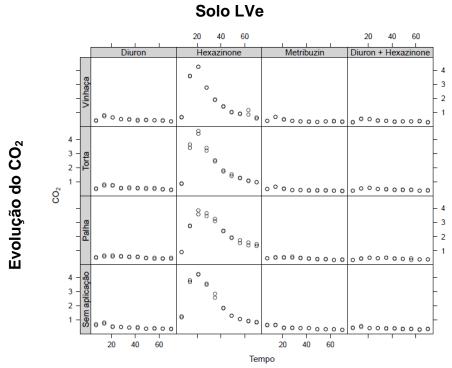


Figura 7 – Gráfico da evolução do  ${\rm CO_2}$  (%) para o solo LVe, em todos os tratamentos e herbicidas, ao longo dos 70 dias de incubação

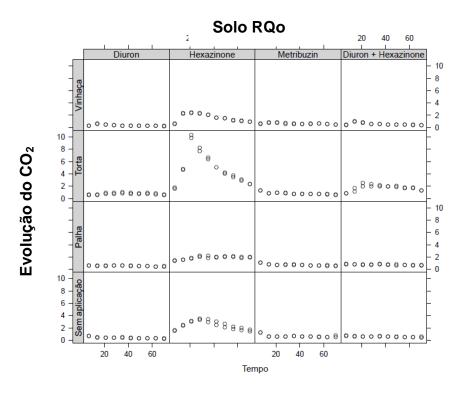


Figura 8 – Gráfico da evolução do CO<sub>2</sub> (%) para o solo RQo, em todos os tratamentos e herbicidas, ao longo dos 70 dias de incubação

Em estudo feito com o herbicida <sup>14</sup>C-atrazina e com os tratamentos palha de milho e glicose + peptona, Peixoto (1998) concluiu que a remobilização dos resíduos ligados não foi influenciada pelos tratamentos. Contudo, no presente estudo para o solo LVe, a análise estatística demostrou que o tratamento com palha de cana-deaçúcar foi o melhor tratamento para os 4 herbicidas estudados, conforme Tabela 11. Peixoto (1998) também observou que os resíduos ligados podem ser remobilizados e que pequenas frações ficaram biodisponíveis para mineralização. Pode-se afirmar que para o solo mais arenoso (RQo) o tratamento mais eficiente foi a torta de filtro, conforme Tabela 14. Pode-se concluir também que o tratamento menos eficiente para ambos os solos e herbicidas foi a vinhaça. Em estudo realizado por Santos et al. (2009), após a adição de vinhaça também não foram detectadas diferenças significativas na quantidade de CO<sub>2</sub> liberados pelos microrganismos aos 30 e 90 dias de incubação.

Em estudo realizado por Dias (2012), o solo RQo apresentou maior lixiviação comparado ao solo LVe, para todos os herbicidas estudados. Pode-se supor então que, ocorrendo a remobilização, há uma maior probabilidade desses herbicidas remobilizados serem lixiviados mais intensamente no solo arenoso (RQo) do que no solo argiloso (LVe).

No solo RQo, o diuron foi mineralizado com menor intensidade, e o tratamento mais eficiente foi a torta de filtro, e os menos eficientes foram a vinhaça e o tratamento sem aplicação de substrato, conforme Tabela 14. Em estudo realizado por Prata et al. (2000), a adição de vinhaça ao solo Terra Roxa Estruturada proporcionou aumento significativo no desprendimento de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> do diuron, pelo fato da vinhaça aumentar a atividade e biomassa microbiana, assim estimulando a mineralização do herbicida. Porém, no mesmo estudo, no solo Latossolo Vermelho-Amarelo, não foi observada alteração no tempo de mineralização do diuron com a presença de vinhaça. Em estudo realizado por Damin (2005), a adição de lodo de esgoto diminuiu significativamente a degradação do diuron, em decorrência dos altos teores de substâncias recalcitrantes presentes na fração orgânica do lodo de esgoto.

Como pode ser observado nas Figuras 7 e 8 e na análise estatística, hexazinone foi o herbicida que mais mineralizou em ambos os solos e em todos os tratamentos. No solo LVe, o hexazinone foi mineralizado mais intensamente no tratamento com palha e menos com vinhaça (Tabela 11) e no solo RQo, foi mineralizado mais intensamente no tratamento com torta de filtro e menos com a vinhaça, conforme Tabela 14.

Observando as Figuras 7 e 8, a mistura diuron + hexazinone apresentou efeito antagônico para o diuron no solo RQo, ou seja, teve uma mineralização pior sozinho do que na mistura, e efeito sinérgico no solo LVe, ou seja, teve uma mineralização melhor sozinho do que na mistura. No caso do hexazinone, houve um efeito sinérgico em relação a mistura para ambos os solos, ou seja, teve uma melhor mineralização sozinho do que na mistura. Os tratamentos mais eficientes para diuron + hexazinone foram: com palha e torta de filtro para o solo LVe, e torta de filtro para o solo RQo.

No solo LVe, os tratamentos mais eficientes para o metribuzin foram: sem aplicação de substrato e com adição de palha, não havendo diferença estatística entre eles, conforme Tabela 11. No solo RQo, os tratamentos mais eficientes foram: com palha e torta de filtro, conforme Tabela 14. Segundo Costa et al. (1997), a adição de folhas de cana-de-açúcar aumentou 13 vezes a mineralização do herbicida ametrina em relação ao solo sem adição de substrato, mostrando a importância da atividade microbiana e do cometabolismo na biodegradação deste herbicida. Muitos autores observaram que a matéria orgânica pode aumentar ou diminuir a biodegradação de pesticidas por ativar a microbiota heterotrófica do solo em alguns casos e, em outros, por favorecer os processos de adsorção. (COSTA, 1992; COX et al., 1996; VROUMSIA, 1996). Como mostrado nesse estudo e por diversos autores, cada pesticida tem comportamento diferente em ambientes diferentes, podendo a adição de substrato ajudar na mineralização ou remobilização do mesmo ou aumentar a sua adsorção.

### 4.2 Identificação dos metabólitos do diuron

Como o herbicida diuron e seus principais metabólitos possuem dois cloros em sua estrutura molecular é possível identifica-los através da relação isotópica e da massa [M + H], e pela presença de [M + H] +2.

A Figura 9 apresenta um cromatograma do herbicida diuron (relação m/z: 232,01) identificado pelo pico de massa mais um próton (relação m/z [M + H]<sup>+</sup>: 233,02) e por um pico de 64% do seu tamanho, com [M + H]<sup>+</sup> + 2, formado devido a presença de dois cloros na sua estrutura molecular (característica da sua relação isotópica). Pode-se notar que os picos e a suas intensidades se equivalem, mostrando que são os mesmos compostos.

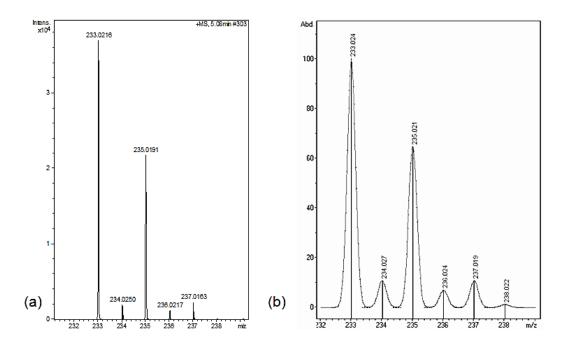


Figura 9 - (a) espectro de massa do composto diuron, e (b) representação isotópica do composto diuron ( $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ ) pelo programa *Compass Isotope Pattern* Versão 1.3, da marca Bruker Daltonics Isotope Pattern

Na amostra de solo contendo o herbicida diuron, o produto original apresentou tempo de retenção de 5,05 min, e seu metabólito DCPMU (1-(3,4-dichlorophenyl)-1-methylurea) foi identificado no tempo de 4,72 min (cuja massa molecular é 219,07 g mol<sup>-1</sup>) com intensidade de 31,23% em relação ao produto original, como demonstrado na Figura 10.

Segundo a USEPA (2003), o metabólito DCPMU é considerado o principal produto de degradação do diuron em fotodegradação no solo, metabolismo aeróbico e anaeróbico em solos, e dissipação em solo e em água. Sua meia vida no solo varia de 217 a 1733 dias.

A curva de calibração do equipamento para o diuron obteve equação da reta y = 58573x - 984,94 e R<sup>2</sup>= 0,9991.

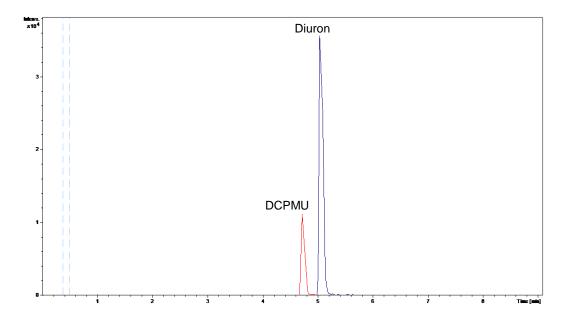


Figura 10 - Cromatograma do diuron (tr: 5,05 min) e DCPMU (tr: 4,72 min)

### 4.3 Identificação dos metabólitos do hexazinone

Na amostra de solo contendo o hexazinone, o composto original apresentou tempo de retenção de 3,99 min e no tempo de 3,67 min foi possível identificar o metabólito B, conforme Figura 11. A curva de calibração do equipamento para o hexazinone obteve equação da reta y = 219514x - 2735,3 e  $R^2 = 0,999$ .

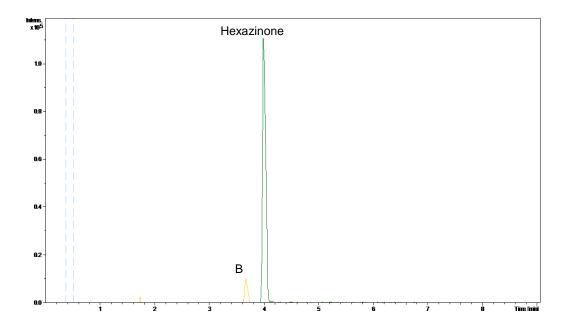


Figura 11 - Cromatograma do hexazinone (tr: 3,99 min) e metabólito B (tr: 3,67 min)

Os metabólitos do hexazinone foram inicialmente identificados por Reiser et al. (1983), que separou cinco produtos de degradação em mudas de plantas. O produto triona, ou seja, [3-ciclo-hexil-1-metil-1,3,5-triazina-2,4,6-(1H,3H,5H)triona], foi identificado como o mais perigoso entre os cinco metabólitos do hexazinone.

Em estudo realizado por Wang et al. (2012) em solos florestais não modificados, a degradação do hexazinone foi relacionada com o conteúdo de carbono orgânico no solo. No mesmo estudo foram detectados o metabólito B em solos não modificados, e os metabólitos B e C em solos com adição de lodo de esgoto. Em outro estudo realizado por Fischer e Michael (1995), foi identificado o metabólito B em quatro espécies de plantas.

#### 4.4 Identificação dos metabólitos do diuron + hexazinone

Na identificação da amostra de solo contendo a mistura de diuron + hexazinone utilizando MicrOTOF-Q, o composto diuron apresentou tempo de retenção de 5,04 min e o composto hexazinone com 4,00 min. Foi identificado o metabólito DCPMU no tempo de 4,72 min (originário do produto diuron), e também

foi possível observar no tempo 3,63 min o metabólito B (cuja massa molecular é 238,14 g mol<sup>-1</sup>) originário do produto hexazinone, conforme Figura 12.

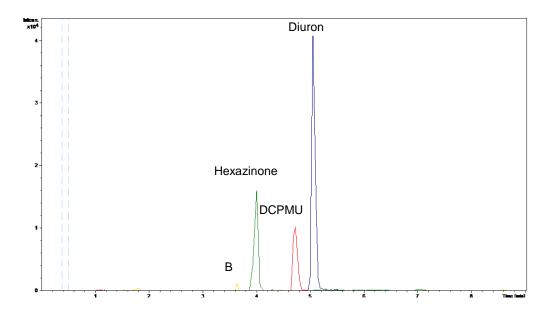


Figura 12 - Cromatograma do diuron (tr: 5,04 min), DCPMU (tr: 4,72 min), hexazinone (tr: 4,00 min) e metabólito B (tr: 3,63 min)

### 4.5 Identificação dos metabólitos do metribuzin

Na amostra de solo contendo o metribuzin, o composto original apresentou tempo de retenção de 4,41 min. Foi possível identificar o metabólito DA (massa molecular de 199,07 g mol<sup>-1</sup>) no tempo de retenção de 3,82 min. Também foi possível identificar o metabólito DADK (massa molecular de 169,18 g mol<sup>-1</sup>), no tempo de retenção de 3,50 min, e o metabólito DK (massa molecular de 184,19 g mol<sup>-1</sup>), no tempo de retenção de 3,30 min, conforme Figura 13. A curva de calibração do equipamento para o metribuzin obteve equação da reta y = 317041x – 8387,9 e R<sup>2</sup>= 0,9986.

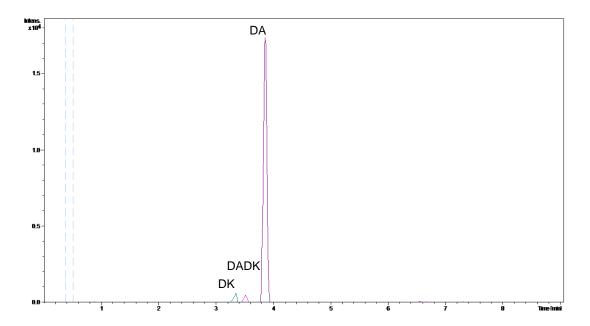


Figura 13 - Cromatograma dos metabólitos DA (tr: 3,82 min), DADK (tr: 3,50 min) e DK (tr: 3,30 min)

Em estudo com o metribuzin, Kjær et al. (2005) sugere que mesmo pequenas quantidades de resíduos pode representar um potencial risco de contaminação das águas subterrâneas. Isto enfatiza a necessidade de estudar o destino a longo prazo de resíduos de agrotóxicos no solo. Como encontrado no presente estudo, Karanasios et al. (2013) também detectaram os metabólitos DA, DK e DADK em amostras de solo, turfa, composto de folhas de oliveira e caules de uvas.

Em estudo realizado por Khoury et al. (2006), a formação do metabólito DA em solo arenoso foi considerada basicamente devido ao resultado da atividade biológica. Já no solo argiloso, o metabólito DK foi resultado de dessulfuração oxidativa, enquanto o DADK foi considerado como produto de desaminação redutora.

### 4.6 Estudo de hidrólise e oxidação

Os estudos de hidrólise e oxidação foram realizados para tentar obter os mesmos metabólitos das amostras de solo do estudo de remobilização. Assim, através do tempo de retenção dos metabólitos, da relação isotópica e da massa molecular, foi possível comparar os picos formados nas amostras do estudo de hidrólise e oxidação com os picos das amostras de solo do estudo de remobilização.

O estudo de hidrólise mostrou a formação do metabólito 3,4-DCA para o composto diuron nos diferentes pHs e temperaturas, podendo compará-lo com o pico de mesma massa molecular na amostra de solo de diuron, e assim foi observado que o suposto metabólito da amostra de solo do estudo de remobilização não era o 3,4-DCA, pois tinham tempos de retenção diferentes. Como pode ser observado na Figura 14, o metabólito 3,4-DCA (originado do composto diuron) teve uma formação crescente até o último tempo de análise, de 360 horas.

Para o composto hexazinone, houve a formação do metabólito D nas condições de 50°C (pH 2 e 12), mostrado na Figura 15, e 25°C (pH 2 e 12), e o metabólito B na condição de 50°C e pH 6, podendo então compará-los com os metabólitos encontrados na amostra de remobilização, descartando a formação do metabólito D e constatando a formação do metabólito B, pois apresentou o mesmo tempo de retenção e massa molecular. Como mostrado na Figura 15, o produto hexazinone se manteve estável nas primeiras 12 horas de hidrólise, e foi mineralizado completamente em 360 horas. O metabólito D surgiu no tempo de 12 horas, e permaneceu estável até 360 horas.

Para o composto metribuzin, houve a formação dos metabólitos DK (25°C e 50°C a pH 2), mostrado na Figura 16, DA (25°C a pH 2, 6 e 12 e 50°C a pH 12) e DADK (25°C e 50°C a pH 12), podendo comparar os tempos de retenção, as relações isotópicas e massas moleculares e assim confirmar a identificação dos metabólitos na amostra de solo do metribuzin no estudo de remobilização. Como mostrado na Figura 16, a degradação do produto metribuzin foi completa no tempo de 360 horas, a 50°C e pH 2. O metabólito DK surgiu no tempo de 12 horas, e atingiu o seu auge de formação em 120 horas, mineralizando até 360 horas.

O estudo de oxidação mostrou a formação do metabólito D para o composto hexazinone e o metabólito DK para o composto metribuzin nos dois pHs.

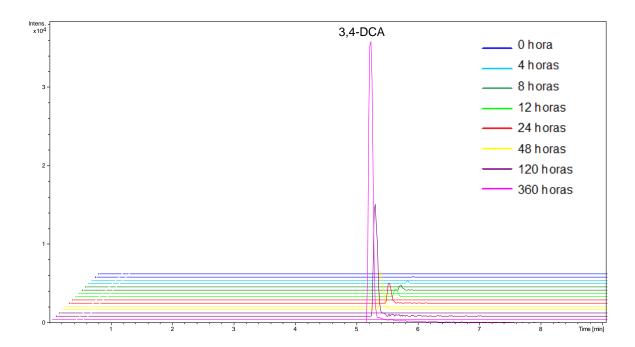


Figura 14 - Cromatograma do metabólito 3,4-DCA no estudo de hidrólise do herbicida diuron (50°C, pH 2)

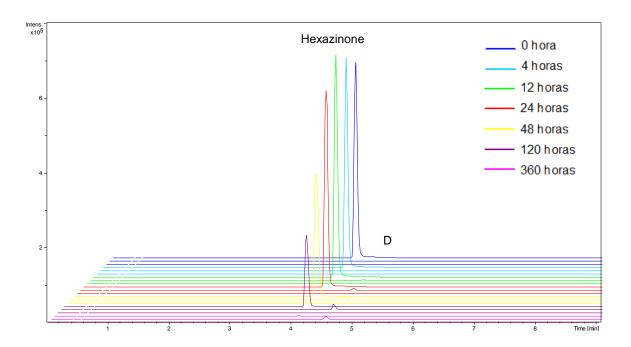


Figura 15 - Cromatograma do hexazinone no estudo de hidrólise (50°C, pH 2), e formação do metabólito D

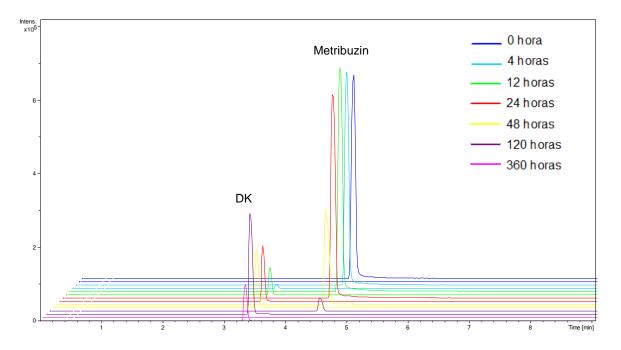


Figura 16 - Cromatograma do metribuzin no estudo de hidrólise (50°C, pH 2), e formação do metabólito DK.

## **5 CONCLUSÕES**

Foi comprovada a remobilização de resíduos ligados dos herbicidas estudados para ambos os solos e todos os tratamentos, possibilitando a degradação e/ou mineralização das moléculas ou a disponibilidade para a extração química.

Pode-se afirmar que para o solo argiloso (LVe) a palha de cana-de-açúcar foi o tratamento mais adequado para remobilizar os resíduos ligados e para o solo arenoso (RQo), o tratamento mais adequado foi a torta de filtro. Pode-se concluir também que o tratamento menos efetivo para ambos os solos e herbicidas foi a vinhaça.

No solo LVe, o hexazinone teve a mineralização favorecida no tratamento com palha e desfavorecida no tratamento com vinhaça, o metribuzin teve a mineralização favorecida no tratamento sem aplicação de substrato e com adição de palha.

No solo RQo, o hexazinone teve a mineralização favorecida no tratamento com torta de filtro e desfavorecida no tratamento com vinhaça; o diuron foi mineralizado em maior quantidade no tratamento com torta de filtro, e em menor quantidade com a vinhaça e sem aplicação de substrato; e a mineralização do metribuzin foi mais evidente nos tratamentos com palha e torta de filtro.

Através da utilização do equipamento UPLC<sup>®</sup>-QTOF, foram identificados o metabólito DCPMU, originado do produto diuron, o metabólito B, originado do produto hexazinone, e os metabólitos DA, DK, e DADK, originados do metribuzin nas amostras de solo contendo resíduo ligado.

Os estudos de hidrólise e oxidação mostraram a formação do metabólito 3,4-DCA para o diuron, dos metabólitos B e D para o hexazinone, e dos metabólitos DK, DA e DADK para o metribuzin.

# **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apontamos a necessidade de mais estudos relacionados a aplicação de substratos em campos de culturas, pois o presente estudo demonstrou que esses substratos podem remobilizar os herbicidas ligados ao solo, e essa remobilização pode tanto ter pontos positivos (ocorrendo a mineralização do herbicida e seus metabólitos) ou negativos (ocorrendo a lixiviação dos compostos até o lençol freático ou reincorporação a solução do solo).

Novas pesquisas relacionadas ao comportamento e destino dos metabólitos no ambiente devem ser realizadas, pois existem poucas informações e dados disponíveis na literatura e há a possibilidade dos metabólitos serem mais agressivos e tóxicos ao meio ambiente do que o produto original.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA JÚNIOR, A. B.; NASCIMENTO, C. W. A.; SOBRAL, M. F.; SILVA, F. B. V.; GOMES, W. A. Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 10, p. 1004–1013, 2011.

CARBO, L.; MARTINS, E. L.; DORES, E. F. G. C.; SPADOTTO, C. A.; WEBER, O. L. S.; FREIRE, E. M. L. Acetamiprid, carbendazim, diuron and thiamethoxam sorption in two Brazilian Tropical Soils. **Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, London, v. 42, n. 5, p. 449-507, 2007.

ANDRADE, J. M. F.; DINIZ, K. M. Impactos ambientais da agroindústria da canade-açúcar: subsídios para a gestão. 2007. 131 p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2007. 131 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. **Agrofit on line**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\_cons/principal\_agrofit\_cons. Acesso em: 19 jun. 2014.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S. J. P. Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: Novas moléculas herbicidas. In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CANA-DE AÇÚCAR, 2., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: INPI, 2005. Disponível em: http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/e5595 a4efa1a6821032570d8004576de/\$FILE/Anais%20Jacob%20Christofoletti.pdf.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Norma CETESB P4.231** - Vinhaça — critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Safra 2014/15. Primeiro Levantamento. Brasília, DF, 2014. p. 1-20.

COSTA, M. A. **Biodegradação de 14C-ametrina em Areia Quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico**. 1992. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

COSTA, M. A.; MONTEIRO, R. T. R.; TORNISIELO, V. L. Influência da adição de palha de cana-de-açúcar na degradação de <sup>14</sup>C-ametrina em solo areia quartzosa. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 117-122, 1997.

- COSTA, M. P. **Efeito da matéria orgânica em alguns atributos do solo**. 1983. 137 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.
- COX, L.; WALKER, A.; WELCH, S. J. Evidence for the accelerated degradation of isoproturon in soils. **Pesticide Science**, London, v. 48, p. 253-260, 1996.
- DAMIN, V. Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida <sup>14</sup>C-diuron em dois Latossolos tratados com lodo de esgoto. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- DIAS, A. C. R. Lixiviação, mobilidade, degradação, mineralização e atividade microbiana de herbicidas em função de atributos de cinco tipos de solos. 2012. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- FISCHER, J. B.; MICHAEL, J. L. Thermospray ionization liquid chromatography—mass spectrometry and chemical ionization gas chromatography—mass spectrometry of hexazinone metabolites in soil and vegetation extracts. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v. 704, p. 131–139, 1995.
- FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; PASTOR-MONTORO, E.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 390, p. 947–959, 2008.
- GEVAO, B.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T.; CRAVEN, A.; BURAUEL, P. Nonextractable pesticide residues in soil. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 37, n. 7, p. 138A–144A, 2003.
- GREEN, A.; LEWIS, K.; COLES, A. FOOTPRINT: creating tools for pesticide risk assessment and management in Europe. In: SCI CONFERENCE - The Voluntary Past Future, York, Hertfordshire. UK: Initiative: and 2007. UK. University of Hertfordshire, 2007. Disponível em: http://researchprofiles.herts.ac.uk/portal/en/publications/footprint-creating-tools-forpesticide-risk-assessment-and-management-in-europe(7444f97c-1314-41fd-81e3e30d5ff911c7).html. Acesso em: 29 maio 2014.
- HESS, D.; WARREN, F. **The herbicide handbook**. 8. ed. Lawrence: Weed Science Society of America, 2002.
- HINDE, J.; DEMÉTIRO, C. G. B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 151-170, 1998.

KARANASIOS, E. C.; TSIROPOULOS, N. G.; KARPOUZAS, D. G. Quantitative and qualitative differences in the metabolism of pesticides in biobed substrates and soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 93, p. 20–28, 2013.

KHOURY, R.; COSTE, C. M.; KAWAR, N. S. Degradation of Metribuzin in Two Soil Types of Lebanon. **Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, London, v. 41, p. 795–806, 2006.

KJÆR, J.; OLSEN, P.; HENRIKSEN, T.; ULLUM, M. Leaching of Metribuzin Metabolites and the Associated Contamination of a Sandy Danish Aquifer. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 39, p. 8374-8381, 2005.

KLAASSEN, C. D. **Casarett and doull's toxicology**: the basic science of poisons. 7. rev. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2008. 1280 p.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013.

LAVORENTI, A. Identificação de perigos de resíduos ligados de pesticidas em substâncias húmicas. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2., 1997, São Carlos. **Anais.** São Carlos: EMBRAPA, CNPDIA, 1997. p. 66-71.

LAVORENTI, A. Remobilização e transporte de resíduos ligados de pesticidas ao solo. In: SIMPÓSIO SOBRE DINÂMICA DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO SOLO; Aspectos práticos e ambientais, 2002, Piracicaba. Piracicaba: ESALQ/USP, 2002. p. 70-78.

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. Comportamento de pesticidas em solos brasileiros. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 3, p. 335-400, 2003.

LORENZI, H. **Manual de identificação e de controle de plantas daninhas**: plantio direto e convencional. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 339 p.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214, 222, 2009.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized linear models**. London: Chapman and Hall, 1989. 511 p.

MOITINHO, M. R.; PADOVAN, M. P.; PANOSSO, A. R.; LA SCALA JUNIOR, N. Efeito do preparo do solo e resíduo da colheita de cana-de-açúcar sobre a emissão de CO<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 1720-1728, 2013.

- OLIVEIRA, M. F. de; BRIGHENTI, A. M. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 263-304.
- OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; KOSKINEN, W. C.; FERREIRA, F. A. Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. **Weed Research**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 97-110, 2001.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT OECD. **OECD Guidelines for Testing of Chemicals**. Test No. 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil. Paris, 2002. 17 p.
- PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Quantitation and identity confirmation of residues of quinolones in tilapia fillets by LC-ESI-MS-MS QToF. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 394, p. 2213-2221. 2009.
- PEIXOTO, M. F. S. Distribuição do herbicida <sup>14</sup>C-atrazina na matéria orgânica de dois solos e remobilização de seus resíduos ligados em ácidos fúlvicos. 1998. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1998.
- PEIXOTO, M. F. S. P. et al. Remobilização de resíduos ligados de <sup>14</sup>C-atrazina em ácidos fúlvicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 340-346, 2005.
- PENATTI, C. P.; DONZELLI, J. L. **Uso da torta de filtro em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Os autores, 1991. 7 p.
- PRATA, F. Biodegradação e adsorção dos herbicidas diuron e ametrina em solos tratados com vinhaça. 1998. 76 p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de herbicidas no solo: influência da matéria orgânica. **Revista de Biociências**, Taubaté, v. 6, n. 2, p. 17-22, 2000.
- PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Degradação e adsorção de diuron em solos tratados com vinhaça. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 217-223. 2000.
- QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS E UPLC-MS/MS. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, 2013. Disponível em: http://www.R-project.org/.

- ROBERTS, T. R. (Ed.). **Metabolic pathways of agrochemicals**. Part 1: Herbicides and plant growth regulators. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001.
- ROBERTS, T. R. Non-extractable pesticide residues in soils and plants. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 56, p. 945-956, 1984.
- ROCHA, W. B. D. Sorção de 2,4-D e diuron nos agregados organominerais de latossolos em função dos conteúdos de matéria orgânica e de água. 2003. 75 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas.** 6. ed. Londrina: Edição dos autores, 2011. 698 p.
- SANTOS, T. M. C.; SANTOS, M. A. L.; SANTOS, C. G.; SANTOS, V. R.; PACHECO, D. S. Fertirrigação com vinhaça e seus efeitos sobre evolução e liberação de CO<sub>2</sub> no solo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 141-145, 2009.
- SILVA-STENICO, M. E.; NETO, R. C.; ALVES, I. R.; MORAES, L. A. B.; SHISHIDO, T. K.; FIORE, M. F. Hepatotoxin Microcystin-LR Extraction Optimization. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 535-542, 2009.
- SINGH, N.; RAUNAQ; SINGH, S. B. Effect of fly ash on sorption behavior of metribuzin in agricultural soils. **Journal of Environmental Science and Health. Part B**, London, v. 47, p. 89–98, 2012.
- SØRENSEN, S. R.; JUHLER, R. K.; AAMAND, J. Degradation and mineralisation of diuron by Sphingomonas sp. SRS2 and its potential for remediating at a realistic  $\mu$ g L<sup>-1</sup> diuron concentration. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 69, n. 11, p. 1239-1244, 2013.
- TIXIER, C.; SANCELME, M.; BONNEMOY, F.; CUER, A.; VESCHAMBRE, H. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, p. 1381-1389, 2001.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR UNICA. **Sustentabilidade Meio Ambiente**. São Paulo, 2011. Disponível em: http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode={0C8534A8-74A7-4952-8280-C5F6FB9276B7}. Acesso em: 05 ago. 2011.
- USEPA. Reregistration Eligibility Decision (RED) Hexazinone. Washington, D.C. 1994.
- USEPA. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Metribuzin. List A Case 0181. Washington, D.C. 1998.
- USEPA. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Diuron. List A Case 0046. Washington, D.C. 2003.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

VICTÓRIA FILHO, R.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Manejo de plantas daninhas e produtividade da cana. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 1, p. 32-37, 2004.

VROUMSIA, T.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BENOITGUYOD, J. L.; KHADRANI, A. Biodegradation of three substitued phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron and isoproturon) by soil fungy. A comparative study. **Chemosphere**, Oxford, v. 33, p. 2045-2056, 1996.

YU, K.; LITTLE, D.; PLUMB, R.; SMITH, B. High-throughput quantification for a drug mixture in rat plasma – a comparison of Ultra Performance™ liquid chromatography/tandem mass spectrometry with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 20, p. 544–552, 2006.